

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

IDENTIFIZIERUNG VON INHIBITOREN DER NOTCH- ODER EBNA2-VERMITTELTEN TRANSKRIPTIVIERUNG VON ZIELGENEN



Agnes M. Mittner

München, 08. Mai 2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Bettina Kempkes

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Boshart

Dissertation eingereicht am: 08. Mai 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 2013

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DAS EPSTEIN-BARR-VIRUS	1
1.1.1 Die Primärinfektion mit EBV	1
1.1.2 Etablierung der persistierenden Infektion.....	2
1.1.3 Die latenten EBV-Gene	2
1.1.4 EBV-assoziierte Tumorerkrankungen und mögliche Therapieansätze	3
1.2 DIE FAMILIE DER CSL-PROTEINE	5
1.2.1 Die Struktur der CSL-Proteine.....	5
1.2.2 Funktion und Interaktionspartner der CSL-Proteinfamilie	7
1.3 DAS ZELLULÄRE PROTEIN NOTCH	8
1.3.1 Die Proteinstruktur von Notch.....	8
1.3.2 Die Notch-Signalwege.....	11
1.3.3 Notch-assoziierte Krankheiten	13
1.4 DAS EPSTEIN-BARR-VIRUS NUKLEÄRE ANTIGEN 2 (EBNA2).....	14
1.4.1 Das Protein EBNA2.....	14
1.4.2 Funktionen von EBNA2	16
1.5 INHIBITOREN VON PROTEIN/PROTEIN-INTERAKTIONEN	18
1.5.1 Antikörper als Inhibitoren von Protein/Protein-Interaktionen	18
1.5.2 „Small molecules“ als Inhibitoren von Protein/Protein-Interaktionen.....	19
1.5.3 Hochdurchsatz-Methoden zur Identifizierung von Inhibitoren von Protein/Protein- Interaktionen	21
1.5.4 Kriterien für die Bewertung von Hochdurchsatz-Verfahren.....	23
1.6 DER ÖSTROGENHORMONREZEPTOR.....	24
1.7 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	25
2 MATERIAL	27
2.1 BAKTERIENSTÄMME	27
2.2 ZELLINIEN	27
2.3 OLIGONUKLEOTIDE/ PRIMER	27
2.4 PLASMIDE	28
2.5 ANTIKÖRPER.....	29

2.6	PEPTIDE.....	30
2.7	MATERIAL FÜR BAKTERIENSTÄMME.....	30
2.8	MATERIAL FÜR ZELLKULTUR.....	30
2.9	DNA- UND PROTEIN-STANDARDS.....	30
2.10	ENZYME UND REAGENZIENSYSTEME	31
2.11	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	31
2.12	VERBRAUCHSMATERIAL	32
2.13	LABORAUSSTATTUNG.....	32
2.14	DATENBANKEN, INTERNET-PROGRAMME UND COMPUTER-SOFTWARE	33
3	METHODEN.....	35
3.1	ARBEITEN MIT BAKTERIENKULTUREN	35
3.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien.....	35
3.1.2	Herstellung CaCl ₂ - kompetenter Bakterien.....	35
3.1.3	Bestimmung der Transformationseffizienz chemisch kompetenter Bakterien	36
3.1.4	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	36
3.2	ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	36
3.2.1	Kultivierung und Aufbewahrung der Zelllinien	36
3.2.2	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	38
3.2.3	Promotor - Reportergenstudien	39
3.2.4	Durchflusszytometrie.....	40
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	42
3.3.1	Arbeiten mit DNA.....	42
3.3.2	Arbeiten mit RNA.....	47
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	49
3.4.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	49
3.4.2	Bakterielle Expression und denaturierende Präparation des CBF1-Proteins.....	49
3.4.3	Bakterielle Expression und native Präparation rekombinanter Proteine	50
3.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	51
3.4.5	Reduzierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.4.6	Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	52
3.4.7	Western Blot	52
3.4.8	Gel-Retardationsanalysen.....	53
3.4.9	„enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)	56
3.4.10	Affinitätspräzipitationen	57
4	ERGEBNISSE	59

4.1	BIOCHEMISCHES TESTSYSTEM ZUR IDENTIFIZIERUNG INHIBITORISCHER „SMALL MOLECULES“	60
4.1.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung von Fragmenten der Interaktionspartner	60
4.1.2	Sind die Fragmente von CBF1, Notch und EBNA2 biologisch aktiv?	69
4.2	ETABLIERUNG DES ELISA-BASIERTEN TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON INHIBITOREN DER CBF1/NOTCH- ODER CBF1/EBNA2-INTERAKTION	76
4.2.1	Welche Konzentrationen der Interaktionspartner sind für ein stabiles Signal notwendig?	77
4.2.2	Kann das ELISA-basierte Testsystem unter den gewählten Reaktionsbedingungen für Hochdurchsatz-Verfahren (HTS) verwendet werden?	83
4.2.3	Hat das Lösungsmittel DMSO einen Einfluss auf die CBF1/Notch-oder CBF1/EBNA2-Interaktion?	90
4.2.4	Können die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktionen im ELISA-basierten Testsystem gehemmt werden?	91
4.2.5	Kann das ELISA-basierte Testsystem auf das 384-Loch-Format reduziert werden?	93
4.3	INHIBITION DER CBF1/NOTCH-INTERAKTION IM ELISA-BASIERTEN TESTSYSTEM	94
4.3.1	„Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC mit dem ELISA-basierten Testsystem	95
4.3.2	Validierung des ELISA-basierten „small molecule screens“ der Naturstoffbank NHC	98
4.4	ZELLBASIERTES TESTSYSTEM ZUR IDENTIFIZIERUNG INHIBITORISCHER „SMALL MOLECULES“	99
4.4.1	Die Indikatorzelllinie JV06	99
4.4.2	Die Kontrollzelllinie MR31.6	101
4.5	ETABLIERUNG DER VERSUCHSBEDINGUNGEN FÜR DAS ZELLBASIERTE HTS-VERFAHREN	103
4.5.1	Welche Induktionsdauer ist für eine messbare GFP-Expression notwendig?	103
4.5.2	Welche Induktor-Konzentrationen führen zu einem halbmaximalen Signal der GFP-Fluoreszenz?	105
4.5.3	Kann das zellbasierte Testsystem, unter den gewählten Reaktionsbedingungen, für HTS verwendet werden?	106
4.5.4	Welche DMSO-Konzentrationen können, ohne das GFP-Signal zu beeinflussen, in dem zellbasierten Testsystem verwendet werden?	110
4.6	INHIBITION DER EBNA2-ABHÄNGIGEN TRANSAKTIVIERUNG IM ZELLBASIERTEN TESTSYSTEM	112
4.6.1	„Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC im zellbasierten Testsystem	112
4.6.2	Bestätigung und Kontrolle der Wirkung von „small molecules“ aus der Naturstoffbank NHC mit der Indikatorzelllinie JV06 und der Kontrollzelllinie MR31.6	117
4.6.3	Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktinpolymerisation, hemmt die ER/EBNA2-Funktion nicht	122
5	DISKUSSION	127
5.1	SIND DIE CBF1/NOTCH- UND DIE CBF1/EBNA2-INTERAKTION BEI DER ENTSTEHUNG VON KRANKHEITEN VON BEDEUTUNG?	127

5.2	HABEN DIE CBF1/NOTCH- UND DIE CBF1/EBNA2-INTERAKTION ÄHNLICHE EIGENSCHAFTEN WIE BEREITS ERFOLGREICH GEHEMMTE ZIELSTRUKTUREN?	128
5.2.1	Charakteristika von Zielstrukturen, die in den Anfängen der HTS-Industrie als geeignet galten	128
5.2.2	Charakteristika der hemmbaren Protein/Protein-Interaktion (PPI) von MDM2 und p53	129
5.2.3	Charakteristika der für diese Arbeit gewählten Protein/Protein Interaktionen	130
5.3	KANN DIE INHIBITION DER ZIELSTRUKTUREN IN HTS-VERFAHREN DETEKTIERT WERDEN?	131
5.3.1	Inhibition der Zielstruktur im biochemischen Testsystem	132
5.3.2	Inhibition der Zielstruktur im zellbasierten Testsystem	135
5.4	HTS VON „SMALL MOLECULE“-BANKEN	136
5.4.1	HTS mit dem biochemischen Testsystem	136
5.4.2	HTS mit dem zellbasierten Testsystem	138
5.5	AUSSCHLUSS VON INHIBITOREN, DIE NICHT SPEZIFISCH DIE ER/EBNA2-FUNKTION BLOCKIEREN ..	139
5.6	POTENTIELLE INHIBITOREN DER EBNA2-ABHÄNGIGEN TRANSAKTIVIERUNG	140
5.6.1	Struktur und Funktion des Proteins Aktin	140
5.6.2	Chondramide stabilisieren F-Aktin	141
5.6.3	Chivosazol A bewirkt die F-Aktin-Depolymerisation	142
5.6.4	Rhizopodin bewirkt die Dimerisierung von G-Aktin	143
5.6.5	Kulkenon hat keine Auswirkung auf das Zytoskelett	144
5.7	BEISPIELE FÜR MÖGLICHE SZENARIEN DER INHIBITION IN DER INDIKATORZELLINIE JV06.....	144
5.7.1	Der Aktininhibitor Cytochalasin D hat keinen Einfluss auf die Expression des Reportergens GFP	147
5.7.2	Inhibition der GFP-Expression aufgrund des östrogenabhängigen zellulären Testsystems ..	148
5.8	AUSBLICK.....	149
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	151
7	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	155
8	DANKSAGUNG	157
9	LEBENS LAUF	159
10	VERÖFFENTLICHUNGEN	161
11	LITERATURVERZEICHNIS.....	163

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lineare und 3D-Darstellung des Proteins CSL und seiner Domänen	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Notch-Domänen und Kristallstruktur von RAM und ANK während der CBF1-Bindung	10
Abbildung 3: Der kanonische Notch-Signalweg (modifiziert aus Bray, 2006)	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen und konservierten Regionen von EBNA2	15
Abbildung 5: Struktur von CBF1-BTD („beta-trefoil domain“) mit dem Notch-Peptid (aus Johnson et al., 2010)	16
Abbildung 6: Das „chemical space“-Modell nach Lipinski und Hopkins (Übersicht: Lipinski, C. & Hopkins, 2004)	20
Abbildung 7: Schritte des „small molecule screens“ im Hochdurchsatzverfahren.....	22
Abbildung 8: Darstellung von CBF1 und dem His-CBF1-BTD-Fragment.....	61
Abbildung 9: Dokumentation der Expression und Aufreinigung des His-CBF1-BTD-Fragments	63
Abbildung 10: Fragmente der CBF1-Interaktionspartner zur bakteriellen Expression mit C-terminalem GST-Tag	65
Abbildung 11: Coomassie Gele zur Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	68
Abbildung 12: Das His-CBF1-BTD-Fragment bindet an Peptide, die von Notch, EBNA2 oder vIRF4 abstammen und das WxP-Motiv beinhalten.....	70
Abbildung 13: Bindung der GST-Fusionsproteine von Notch und EBNA2 an CBF1 in Gel-Retardationsexperimenten	73
Abbildung 14: Das His-CBF1-BTD-Fragment bindet Fusionsproteine von Notch und EBNA2, aber nicht das GST-Protein oder Glutathion Sepharose Beads.....	75
Abbildung 15: Ermittlung der optimalen Konzentration von His-CBF1-BTD zur Beschichtung der ELISA-Platten.....	78
Abbildung 16: Bindung von GST, GST-EBNA2-CR6 und GST-Notch-RAMANK an eine ELISA-Platte mit und ohne His-CBF-BTD-Beschichtung.....	82
Abbildung 17: Messung der maximalen, halbmaximalen und minimalen Absorptionssignale zur Bestimmung des Signal-Windows und des Z'-Faktors	85
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Hit-Wahrscheinlichkeit in den ELISA-basierten Testsystemen	88
Abbildung 19: Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion im ELISA-basierten Testsystem	90
Abbildung 20: Inhibition der Interaktion von His-CBF1-BTD mit den GST-Fusionsproteinen durch ein vIRF4-Peptid, welches das WxP-Motiv enthält	92
Abbildung 21: Signale der CBF1/Notch-Interaktion im ELISA-basierten Testsystem im 384-Loch-Format	94
Abbildung 22: „Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC mit dem ELISA-basierten Testsystem	97

Abbildung 23: Die charakteristischen Merkmale der Indikatorzelllinie JV06.....	100
Abbildung 24: Die charakteristischen Merkmale der Kontrollzelllinie MR31.6	102
Abbildung 25: Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Zelllinie JV06	104
Abbildung 26: Bestimmung der Konzentration des Induktors, die zur halbmaximalen Expression des Reporterproteins GFP in den Indikatorzelllinien notwendig ist	105
Abbildung 27: Ermittlung des Signal-Windows des auf der Zelllinie JV06 basierten Testsystems	107
Abbildung 28: Graphische Darstellung der Hit-Wahrscheinlichkeit in dem zellbasierten Testsystem ...	109
Abbildung 29: Einfluss von DMSO auf das Fluoreszenzsignal von GFP und den Anteil der lebenden Zellen	111
Abbildung 30: Zeitlicher Ablauf eines „small molecule screens“	112
Abbildung 31: Belegung der Platten in einem „small molecule screen“	113
Abbildung 32: „Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC mit dem zellbasierten Testsystem ...	115
Abbildung 33: Bestätigung und Kontrolle der inhibitorischen Wirkung von „small molecules“ aus der Naturstoffbank NHC in der Indikatorzelllinie JV06 und der Kontrollzelllinie MR31.6 (folgende Seite)	119
Abbildung 34: Einfluss des Aktininhibitors Cytochalasin D auf die GFP-Expression in der Indikatorzelllinie und der Kontrollzelllinie (folgende Seite)	123
Abbildung 36: Struktur von G-Aktin und einem Aktinfilament (Übersicht: Alberts, 2008)	140
Abbildung 37: Struktur der Chondramide A bis D.....	141
Abbildung 38: Struktur der Chivosazole	142
Abbildung 39: Struktur von Rhizopodin.....	143
Abbildung 40: Struktur von Kulkenon.....	144
Abbildung 41: Überblick einiger möglicher Szenarien der GFP-Expression im zellulären Testsystem ...	146
Abbildung 42: Struktur von Cytochalasin D	147

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: exprimierte Gene und Transkriptionsprogramme des EBV während der Infektion (Übersicht: Saha, A. & Robertson, 2011).....	3
Tabelle 2: Kriterien der „Lipinski rule of five“	19
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.....	27
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.....	27
Tabelle 5: Oligonukleotide für Gel-Retardationsstudien	27
Tabelle 6: Primer zur Herstellung der Expressionskonstrukte von Proteinfragmenten	28
Tabelle 7: In der Arbeitsgruppe Kempkes bereits vorhandene Plasmide	28
Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte Expressionskonstrukte.....	29
Tabelle 9: Primäre Antikörper	29
Tabelle 10: Sekundäre Antikörper	29
Tabelle 11: Sequenzen der Biotin gekoppelten Peptide.....	30
Tabelle 12: PCR-Programm für die PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase.....	43
Tabelle 13: Das <i>real-time</i> PCR-Programm	47
Tabelle 14: Das Programm für die cDNA-Synthese.....	49
Tabelle 15: Die Reaktionsansätze zur Radioaktiven Markierung der Oligos	54
Tabelle 16: Zusammensetzung der Reaktionsansätze zur Gelelektrophorese	55
Tabelle 17: Die Zusammensetzung eines 6%-igen Polyacrylamidgeles.....	55
Tabelle 18: Bestimmung des EC ₅₀ -Wertes von GST-Notch-RAMANK für die Bindung an His-CBF1-BTD ...	80
Tabelle 19: Bestimmung des EC ₅₀ -Wertes von GST-EBNA2-CR6 für die Bindung an His-CBF1-BTD	81
Tabelle 20: Für die „small molecule screens“ verwendeten „small molecule“-Banken	95
Tabelle 21: Potentielle „small molecule“-Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2	116
Tabelle 22: Für die „small molecule screens“ verwendeten „small molecule“-Banken	136
Tabelle 23: Naturstoffe, die nur die EBNA2-abhängige GFP-Expression in der Indikatorzelllinie inhibieren	139

Zusammenfassung

Das stark konservierte zelluläre Protein Notch ist während der Entwicklung und dem Erhalt von Geweben von großer Bedeutung. Mutationen von Notch, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Notch-Signalweges führen, wurden in lymphoblastischen Leukämien und auch in soliden Tumoren nachgewiesen. Das Epstein-Barr-Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA2) wird als das virale Analog von Notch beschrieben. Bei der B-Zell-Transformation und der EBV-Infektion ist EBNA2 ein Schlüsselprotein, da es die Transkription von viralen und auch zellulären Genen reguliert. Die EBV-Infektion ist mit zahlreichen Erkrankungen, wie z.B. dem Posttransplantat Lymphom (PTLD) assoziiert, in denen das Protein EBNA2 exprimiert wird. Sowohl Notch als auch EBNA2 sind bei der Regulation ihrer Zielgene auf das zelluläre DNA Bindeprotein CBF1 angewiesen. CBF1 bildet eine hydrophobe Bindetasche, die für die Interaktion mit einem WxP-Motiv (Tryptophan-Aminosäure X-Prolin) innerhalb von Notch und EBNA2 notwendig ist. Diese Interaktion könnte als mögliche Zielstruktur bei der Identifizierung von Therapeutika für Erkrankungen dienen, welche durch die Fehlregulation von Notch induziert oder mit der EBV-Infektion assoziiert sind.

In dieser Arbeit wurden Testsysteme entwickelt, die es ermöglichen, im hohen Durchsatz (HTS) „small molecule“-Banken auf Substanzen zu durchsuchen („screenen“), welche direkt die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion verhindern oder allgemein die CBF1-abhängige Transaktivierung durch Notch oder EBNA2 hemmen. Zum Einen wurde ein biochemisches Testsystem etabliert, das auf der ELISA-Methode basiert und es ermöglicht, die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion unter isolierten Bedingungen zu hemmen. Außerdem wurde ein zellbasiertes Testsystem entwickelt, das auf der Durchflusszytometrie basiert und aus zwei Zelllinien besteht: einer Indikatorzelllinie, in der die Transaktivierung des Reportergens GFP von EBNA2 abhängig ist und einer Kontrollzelllinie, in der das Reportergen GFP EBNA2-unabhängig exprimiert wird. Das zellbasierte Testsystem ermöglicht es, gleichzeitig zu überprüfen, ob ein „small molecule“ die Transaktivierung EBNA2-abhängig hemmt und ob diese Substanz eine toxische Wirkung auf die Zellen hat. Sowohl mit dem biochemischen Testsystem zur CBF1/Notch-Interaktion als auch mit dem zellbasierten Testsystem zur EBNA2-abhängigen Transaktivierung wurde die Wirkung von 1360 chemischen Substanzen aus drei „small molecule“-Banken untersucht. Mit dem biochemischen Testsystem wurde bisher kein Inhibitor der CBF1/Notch-Interaktion identifiziert, obwohl dieses Testsystem den Qualitätskriterien für HTS-Verfahren entspricht. In dem zellulären Testsystem konnte jedoch gezeigt werden, dass sieben der 1360 chemischen Substanzen die EBNA2-abhängige Transaktivierung des Reportergens hemmen. Sechs dieser „small molecules“ haben einen Einfluss auf die Aktinpolymerisation. Deshalb konnte man zunächst nicht ausschließen, dass die Inhibition der Aktinpolymerisation einen Einfluss auf die EBNA2-Funktion hat. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die EBNA2-Funktion in dem zellulären Testsystem nicht Aktin-abhängig ist. Der siebten Substanz, Kulkenon, wurde bisher noch keine Wirkung in einem anderen biologischen Testsystem zugeschrieben.

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde erstmals 1964 von M. A. Epstein, B. G. Achong und Y. M. Barr in einer Burkitt Lymphom-Zellkultur elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Epstein, Achong & Barr, 1964). Das Virus gehört aufgrund seines Zelltropismus für Lymphozyten zu den γ -Herpesviren und wird auch als Humanes Herpesvirus 4 (HHV4) bezeichnet. Es ist wie alle Herpesviren aus Core mit doppelsträngiger DNA, Kapsid, Tegument und Lipoproteinhülle aufgebaut. Das 172 kb große Genom liegt im Viruspartikel linear und im Kern infizierter Zellen als ringförmig geschlossenes Episom vor. In vitro führt die EBV-Infektion von B-Zellen zu unbegrenzt proliferierenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). In vivo dagegen persistiert das Virus in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen, die im peripheren Blut zirkulieren (Übersicht: Kieff & Rickinson, 2007).

1.1.1 Die Primärinfektion mit EBV

EBV wird durch Tröpfcheninfektion übertragen und infiziert B-Lymphozyten, indem es zunächst über das Glykoprotein gp350/220 an den Komplementrezeptor CR2 (=CD21) bindet. Anschließend wird durch Interaktion des viralen gp42 mit dem humanen HLA II die Fusion mit der Membran der B-Zelle ausgelöst (Übersicht: Hutt-Fletcher, 2007). 90% der Bevölkerung, unabhängig von der geographischen Lage ihres Wohnortes, sind infiziert. Kommt es bereits im frühen Kindesalter zu einer Infektion, so verläuft diese asymptomatisch. In Industriestaaten mit hohen Hygienestandards, kann die Erstinfektion im jugendlichen oder erwachsenen Alter stattfinden, was in 30-50% der Fälle zu Infektiöser Mononukleose (IM), auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt, führt. Die IM ist eine akute, aber selbst limitierende Krankheit, die sich häufig mit den Symptomen Halsschmerzen, Fieber und stark geschwollenen Lymphknoten äußert (Hislop, Taylor, Sauce & Rickinson, 2007). Im Blut eines akut an IM erkrankten Patienten sind 1% der B-Zellen mit EBV infiziert (Übersicht: Kuppers, 2003). Bis zu 5% der CD8+ T-Zellen können sowohl lytische als auch latente Antigene des EBV erkennen. Diese spezifischen CD8+ T-Zellen eliminieren EBV-infizierte B-Zellen, die virale Proteine exprimieren, so dass die akute IM kontrolliert wird (Übersicht: Young & Rickinson, 2004).

1.1.2 Etablierung der persistierenden Infektion

EBV nutzt bei der B-Zellinfektion, der Aufrechterhaltung der Infektion und der Replikation die Mechanismen der B-Zell-Differenzierung nach Antigenkontakt. Nach Infektion von ruhenden B-Zellen führt die Expression von viralen Genen der Latenzphase III („growth program“) zur Aktivierung der B-Zellen. Das bedeutet, dass die Zellen ohne Antigenkontakt und Signale von außen zu proliferierenden B-Zell-Blasten werden. Die meisten B-Zellen werden in diesem Stadium durch die zuvor erwähnten zytotoxischen CD8+ T-Zellen eliminiert. Einige B-Zellen gelangen jedoch in das Keimzentrum, in dem zunächst die viralen Gene der Latenz II („default program“) exprimiert werden. Verlassen infizierte B-Zellen das Keimzentrum als Gedächtnis B-Zellen, werden nur noch die Gene der Latenz I („latency program“) oder sogar keine viralen Gene (Latenz 0) transkribiert (Übersicht: Thorley-Lawson, 2005). Es besteht auch die Möglichkeit, dass nicht nur ruhende B-Zellen, sondern auch Gedächtnis-B-Zellen und B-Zellen des Keimzentrums direkt mit EBV infiziert werden, so dass diese nicht mehr alle Stadien der B-Zell-Differenzierung nach Infektion durchlaufen (Übersicht: Kuppers, 2003). Während der latenten Infektion, in der keine Symptome auftreten, sind ca. 1-50 von 10^6 der peripheren B-Zellen EBV positiv. Gelegentlich wird das Virus reaktiviert, so dass es zur lytischen Replikation des Virus kommt und Viruspartikel freigesetzt werden (Übersicht: Kuppers, 2003).

1.1.3 Die latenten EBV-Gene

EBV kodiert für neun unterschiedliche Latenz-assoziierte Proteine: die „latent membrane proteins“ (LMPs), die sich in der Membran befinden und die „EBV nuclear antigens“ (EBNAs), die im Nukleus lokalisiert sind. Außerdem werden nicht-kodierende kleine RNAs (EBER) und Mikro RNAs (miRNA) exprimiert. Abhängig von der Infektionsphase (Kapitel 1.1.2) werden unterschiedliche Transkriptionsprogramme von EBV verwendet und somit unterschiedliche Gene exprimiert. Tabelle 1 stellt einen Überblick der unterschiedlichen Gene mit ihren Funktionen und dem Transkriptionsprogramm, während dem sie exprimiert werden, dar (Übersicht: Saha, A. & Robertson, 2011).

latentes Gen	Funktion	Latenzphase
EBNA1	essentiell für die B-Zell-Immortalisierung; beteiligt an der Replikation des EBV-Genoms und an der Verteilung des viralen Genoms während der Mitose	I,II, III
EBNA2	essentiell für die B-Zell-Immortalisierung; interagiert mit CBF1; reguliert die Transkription von viralen und zellulären Zielgenen	III
EBNA3A EBNA3B EBNA3C	interagieren mit CBF1; E3A und E3C wirken als Antagonisten der Transaktivierung durch EBNA2; beeinflussen den Zellzyklus und Apoptose sowie die Umstrukturierung des Chromatins und des Zytoskeletts	III
EBNA LP	interagiert mit EBNA2 und kooperiert bei der Transkriptionsinduktion von viralen und zellulären Zielgenen	III
LMP1	essentiell für die B-Zell-Immortalisierung; imitiert einen konstitutiv aktiven CD40 Rezeptor, der Signalwege wie NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), JNK (c-Jun N-Terminal Kinase), Cdc42 („small GTPase“) und JAK-STAT (Janus-activated kinase-signal transducers and activators of transcription) aktiviert	II, III
LMP2A LMP2B	blockieren den Signalweg des BCR (B-Zell-Rezeptor) und führen zum Eintritt in die Latenz	II, III
EBER	interagiert mit der Proteinkinase PKR und induziert IFN (Interferon) und IL-10 (Interleukin)	I, II, III
BART BHRFI	mi RNAs des BamHI A (BART) oder BamHI H (BHRFI) Clusters; Funktion weitgehend unbekannt;	nicht genau bekannt

Tabelle 1: exprimierte Gene und Transkriptionsprogramme des EBV während der Infektion (Übersicht: Saha, A. & Robertson, 2011)

1.1.4 EBV-assoziierte Tumorerkrankungen und mögliche Therapieansätze

Die Fähigkeit von EBV Zellen zu transformieren, kann auch zu der Entwicklung von B-Zell Lymphomen und Karzinomen führen. EBV ist mit drei unterschiedlichen Lymphomen assoziiert, die von B-Zellen aus unterschiedlichen Stadien der Differenzierung abstammen. Diese Lymphome sind: das endemische Burkitt Lymphom (BL), das Hodgkin Lymphom (HL) und immunoblastoide Lymphome von immunkomprimierten Patienten, wie z.B. das Posttransplantat Lymphom (PTLD) oder das „primary central nervous system lymphoma“ (PCNSL) von AIDS-Patienten (Übersicht: Kutok & Wang, 2006).

PTLDs können nach Transplantation von Organen und von Knochenmark auftreten. Lymphome nach der Organtransplantation entstehen mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-8%. Die Transplantation von Knochenmark führt bei ca. 1% der Patienten zu Lymphomen, die ihren Ursprung in B-Zellen des Donors haben, welche ohne Kontrolle durch EBV-spezifische CD8+ T-Zellen unbegrenzt proliferieren können. Behandlungsmöglichkeiten von PTLD sind einerseits die Reduktion der Immunsuppression, was jedoch zur Abstoßung der Organe führen kann, und andererseits der Einsatz des B-Zell-spezifischen Antikörpers Rituximab (Choquet et al., 2007). Eine weitere Therapiemöglichkeit, ist die adaptive Immuntherapie, bei der EBV-infizierte

lymphoblastoide Zellen verwendet werden, um *ex vivo* EBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zu generieren. EBV-spezifische CTLs können expandiert und anschließend reinfundiert werden. Diese Therapie ist allerdings zeit- und kostenaufwendig, da für jeden Patienten spezifische CTLs generiert werden müssen (Kalinova, Indrakova & Bachleda, 2009). **PCNSL** tritt spät während der AIDS Erkrankung auf, wenn der Patient eine sehr niedrige Anzahl an CD4+ T-Zellen (<100 Zellen/ μ l) aufweist. Durch Einsatz von HAART („highly active antiretroviral therapy“) ist das Vorkommen von PCNSL gesunken. Patienten mit PCNSL werden mit Radio- und Chemotherapie behandelt. Auch der Einsatz von Nukleosidanaloga wie z.B. Gancyclovir oder Acyclovir, welche die virale DNA Synthese inhibieren, hat positive Effekte auf den Krankheitsverlauf (Gonzalez-Aguilar & Soto-Hernandez, 2011). Obwohl in PTLD und PCNSL alle latenten EBV-Gene der Latenzphase III exprimiert werden, sind bisher noch keine EBV-spezifischen Therapien vorhanden.

Das **Hodgkin Lymphom** (HL) wird durch die Präsenz von mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen, die von einem Klon abstammen, charakterisiert. Reed-Sternberg-Zellen umfassen jedoch nur 1% der Tumormasse, die im Weiteren aus Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen besteht. Weltweit beträgt die Inzidenz 2-3 Fälle pro 10^5 Personen. In der westlichen Welt sind HL zu ca. 40% und bei Kindern in Zentralamerika zu 90% der Fälle mit einer EBV-Infektion assoziiert, in der die Gene der Latenz II exprimiert werden (Übersicht: Kuppers, 2003). Die Therapieansätze beruhen bisher auf Chemotherapie, Radiotherapie und anschließender Stammzelltransplantation (Oerlemans, Mols, Nijziel, Lybeert & van de Poll-Franse, 2011). Da in der Latenz II die Latenzgene EBER, EBNA1, LMP1 und LMP2A exprimiert werden, könnten diese auch als mögliche Zielstruktur in EBV-assoziierten HL dienen.

Es gibt drei klinische Varianten des **Burkitt Lymphoms** (BL), das eine charakteristische Translokation des *c-Myc* Onkogens und des Immunglobulins hat. Das endemische BL tritt häufig (Inzidenz 50-100 Fälle pro 10^6 Personen) in Äquatorialregionen von Afrika, Papua und Neuguinea auf. 100% der endemischen Burkitt Lymphome sind mit EBV assoziiert. Das sporadische BL hat eine Inzidenz von 2-3 Fällen pro 10^6 Personen und wird meist bei Kindern und Jugendlichen der westlichen Welt diagnostiziert. Diese BL-Variante ist nur zu ca. 15% mit EBV assoziiert (Übersicht: Thorley-Lawson & Allday, 2008). Schließlich tritt das BL auch bei AIDS-Patienten auf. In diesem Fall sind 30-40% der Tumorzellen EBV-positiv (Übersicht: Young & Rickinson, 2004). In BL, die EBV beinhalten, werden die Gene der Latenz I exprimiert.

Neben den Lymphomen ist EBV auch mit dem Nasopharynx Karzinom (**NPC**) assoziiert. NPC besteht aus kaum oder nicht differenzierten Karzinomzellen, die stark von Lymphozyten infiltriert werden. NPC ist zu 100% mit EBV Infektionen assoziiert, wobei nur die Karzinomzellen,

aber nicht die Lymphozyten EBV beinhalten. Weltweit sind NPCs selten, die Inzidenz in Südostasien, der Arktis und Nordafrika ist jedoch hoch. Es werden die Gene der Latenz II exprimiert. Im Zusammenhang mit NPC gibt es mehrere Ansätze, durch die Inhibition von LMP1, eine EBV-spezifische Therapie zu entwickeln (Chen et al., 2012; Smith et al., 2012; Yang, Lu, Ma, Cao & Sun, 2010).

1.2 Die Familie der CSL-Proteine

Hamaguchi et.al. haben 1989 erstmalig ein Protein der Maus beschrieben, das an die Erkennungssequenz zur Rekombination des Immunoglobulins J kappa zu binden schien (Hamaguchi, Matsunami, Yamamoto & Honjo, 1989). Daher wurde dieses Protein zunächst RBP-J κ genannt. Später wurde jedoch gezeigt, dass die Bindung an eine flankierende Sequenz des Rekombinationssignals, die aus den Basen „GTGGGAA“ besteht, erfolgt (Chung, Hamaguchi, Honjo & Kawaichi, 1994; Tun et al., 1994). Die unterstrichenen Basen sind notwendig für die Bindung des Proteins an die DNA. Substitutionen der anderen Basen werden toleriert (Del Bianco et al., 2010). Die Bindesequenz gibt es auch im viralen Genom von EBV, wie zum Beispiel im Bereich des C-Promotors, an den das RBP-J κ Protein ebenfalls bindet (Ling, Rawlins & Hayward, 1993). Aufgrund dieser Bindeeigenschaft wird RBP-J κ auch als CBF1 („C-promotor binding factor“) bezeichnet. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird der Name CBF1 verwendet, da mit einem humanen Protein im EBV-Kontext gearbeitet wurde. Es gibt vier humane Transkripte von CBF1, die sich nur in den ersten Aminosäuren unterscheiden. In den Organismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* wurden die zu CBF1 homologen Proteine „suppressor of hairless“ (SuH, *D. melanogaster* (Furukawa et al., 1991)) und „lin-12 and glp-1“ (Lag-1, *C. elegans* (Lambie & Kimble, 1991)) beschrieben. Zusammen werden die Proteine CBF1, SuH und Lag-1 auch als Familie der CSL-Proteine bezeichnet.

1.2.1 Die Struktur der CSL-Proteine

Die Proteine der CSL-Familie sind, wie bereits erwähnt, zwischen den Arten stark konserviert. Das bedeutet, dass sie eine gemeinsame Kernsequenz haben, sich aber an den Carboxy (C)-, sowie den Amino (N)-Termini unterscheiden. Sie sind bei *C. elegans* und Mensch zu 50%, bei *Drosophila* und Mensch zu 72% und bei Maus und Mensch zu 97% homolog (Vergleiche der Proteinsequenzen von Mensch (NP_005340), Maus (NP_033061), *Drosophila* (P28159) und *C. elegans* (NP_741410) in (Furukawa et al., 1991; Kovall & Hendrickson, 2004; Pursglove &

Mackay, 2005)). Mittels Computeranalysen wurden in der Kernsequenz aller CSL-Proteine zwei Rel-homologe Regionen (RHR-C und RHR-N) definiert, die darauf hindeuten, dass die CSL-Proteine entfernte Verwandte der Rel-Familie der Transkriptionsfaktoren sind. Beispiele für Rel-Proteine sind NFAT („Nuclear factor of activated T-cells“) oder NF- κ B („Nuclear Factor- κ B“). Sie alle beinhalten die IPT/TIG Domäne, die eine Immunglobulin ähnliche Faltung hat (Nam, Weng, Aster & Blacklow, 2003). Ein klares Bild der Domänen von CSL-Proteinen wurde erst mit der Veröffentlichung der Kristallstruktur von der Kernsequenz von Lag-1 (*C. elegans*), die an ein DNA-Fragment des Hes Promotors gebunden ist, ermöglicht (Kovall & Hendrickson, 2004). Später wurde auch die Kristallstruktur von CBF1 veröffentlicht (Nam, Sliz, Song, Aster & Blacklow, 2006), die bis auf geringe Unterschiede der Struktur von Lag-1 entspricht (Friedmann, Wilson & Kovall, 2008). Die Kernsequenz der CSL-Proteine bildet drei strukturelle Domänen, die durch Faltung entstehen: die C-terminale Domäne (CTD) und die N-terminale Domäne (NTD), die den vorhergesagten RHR Domänen entsprechen, sowie einer modifizierten β -Kleeblatt-Domäne („ β -trefoil domain“, BTD), die ein langes β -Faltblatt (β C4) beinhaltet. Außerdem ist in der 3D-Struktur zu erkennen, dass die erste α -Helix des N-Terminus der Primärstruktur in der Tertiärstruktur zu CTD gehört. Die DNA-Bindung erfolgt nicht durch eine spezifische Domäne, sondern ist von Teilen der NTD und BTD abhängig. Die Aufteilung der Domänen in der linearen Darstellung sowie in der Kristallstruktur veranschaulicht Abbildung 1.

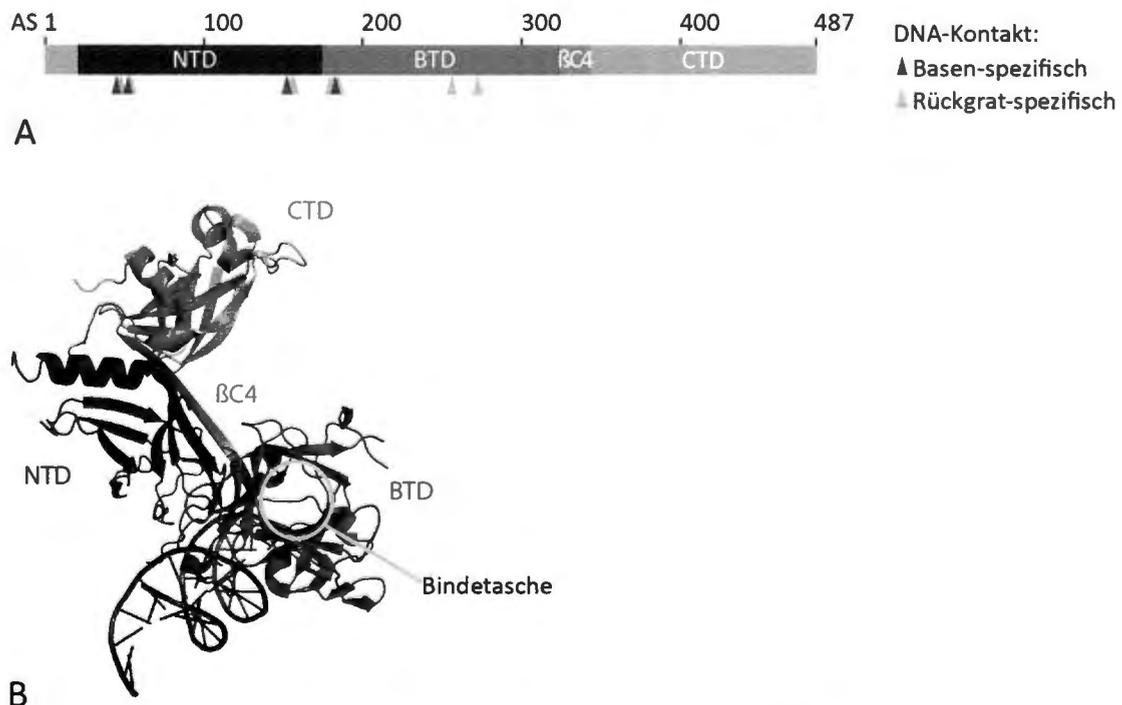


Abbildung 1: Lineare und 3D-Darstellung des Proteins CSL und seiner Domänen

(A) Die Domänen des Proteins CSL (C_{BF1}, S_{uH} und L_{ag-1}), die man als NTD (N-terminale Domäne), BTD („beta-trefoil domain“) mit β C4 (langer β -Faltblatt Strang) und CTD (C-terminale Domäne) bezeichnet, in linearer Darstellung. Rote Spitzen markieren den direkten Kontakt von Aminosäuren zu den DNA-Basen, gelbe Spitzen markieren den Kontakt von Aminosäuren mit dem DNA-Rückgrat. (B) Die Kristallstruktur von CSL/Lag-1 (3BRD). Die Domänen NTD und CTD befinden sich in räumlicher Nähe. BTD und NTD stellen zusammen den DNA Kontakt her. Die β -Faltblattstruktur β C4 hat Kontakt zu allen anderen Domänen des Proteins.

1.2.2 Funktion und Interaktionspartner der CSL-Proteinfamilie

Die CSL-Proteine sind, wie bereits erwähnt, DNA-bindende Proteine, die an die Sequenz „GTGGGAA“ binden (Del Bianco et al., 2010). Sie werden ubiquitär exprimiert und spielen eine Rolle in der Regulation der Transkription aller Metazoen (Übersicht: Lai, 2002). Ein „knock out“ (K.O.) von CBF1 hat *in vitro* keinen Einfluss auf die Viabilität von B-Zellen oder Fibroblasten (Maier et al., 2005; Oka et al., 1995). *In vivo* führt ein K.O. jedoch zum Tod im frühen Embryonalstadium bei Mäusen (Oka et al., 1995). Durch die Bindung in Promotorbereichen sind die CSL-Proteine sowohl an der Transkriptionsaktivierung als auch an der Repression der Transkription beteiligt (Übersicht: Lai, 2002). Die Adapterfunktion von CBF1 wird sowohl von dem zellulären Protein Notch als auch von den EBV-Proteinen EBNA2 (Henkel, Ling, Hayward & Peterson, 1994) und EBNA3A und C (Robertson, Lin & Kieff, 1996), sowie von den KSHV-Proteinen vIRF4 (Heinzelmann et al., 2010) und RTA (Liang, Chang, Lynch, Lukac & Ganem, 2002) genutzt.

Die Aktivierung der Transkription erfolgt nur nach der Rekrutierung von Co-Aktivatoren durch CBF1. Die am besten beschriebenen Funktionen von CBF1 sind die Beteiligung an der transkriptionellen Aktivierung von Genen im Notch-Signalweg (Kapitel 1.3) und die Rolle, die CBF1 bei der Transkriptionsaktivierung durch das virale Protein EBNA2 spielt (Kapitel 1.4).

Bisher wurden drei unterschiedliche Mechanismen der Repression durch CBF1 beschrieben. Zum Ersten bindet CBF1 die Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIA, so dass diese die Transkription nicht mehr aktivieren können (Olave, Reinberg & Vales, 1998). Zweitens kann CBF1 Bindestellen in Promotorregionen blockieren. So überlappt die CBF1-Bindestelle mit Bindestellen des Transkriptionsfaktors NF- κ B im Promotorbereich von IL-6 (Kannabiran, Zeng & Vales, 1997; Plaisance, Vanden Berghe, Boone, Fiers & Haegeman, 1997) oder NF- κ B2 (Oswald, Liptay, Adler & Schmid, 1998) und verhindert dadurch die Transkriptionsaktivierung durch NF- κ B. Später konnte gezeigt werden, dass die Bindung von CBF1 im IL-6 Promotor einerseits eine von zwei

C/EBP („CCAAT/enhancer binding protein“) Bindestellen verdeckt, die für die Transkriptionsaktivierung notwendig sind und andererseits den Aktivatorkomplex aus C/EBP und p65 bindet (Vales & Friedl, 2002). Eine dritte Möglichkeit der Transkriptionsrepression durch CBF1 ist die Rekrutierung von Co-Repressoren, die für Chromatinmodifikationen verantwortlich sind. Beispiele für Co-Repressoren sind: CIR („CBF1 interacting corepressor“), der parallel mit HDAC („Histone deacetylase complex“) und Sap30 („Sin3A-associated protein“, MW 30 kDa) interagieren kann (Hsieh, Zhou, Chen, Young & Hayward, 1999), SMRT („silencing mediator of retinoid and th thyroid hormone receptors“)/ HDAC-1 („Histone deacetylase complex-1“) (Kao et al., 1998), SKIP („Ski-interacting protein“) (Zhou, Fujimuro, Hsieh, Chen & Hayward, 2000; Zhou, Fujimuro, Hsieh, Chen, Miyamoto, et al., 2000), SHARP („SMRT/HDAC1 associated repressor protein“) (Oswald et al., 2002) und MINT („Msx2-interacting nuclear target protein“) (Kuroda et al., 2003).

1.3 Das zelluläre Protein Notch

Bereits 1911 wurde von T.H. Morgan bei *D. melanogaster* ein eingekerbter („notched“) Phänotyp der Flügel beschrieben (Morgan, 1911). Allerdings wurde der Genlocus von *notch*, dessen Mutation für diesen Phänotyp verantwortlich ist, erst 1983 von Artavanis-Tsakonas (Artavanis-Tsakonas, Muskavitch & Yedvobnick, 1983) identifiziert. Das Notch Protein ist stark konserviert. Im Genom von *D. melanogaster* ist ein Notch-Protein kodiert, *C. elegans* hat zwei Notch-Proteine und Säugetiere besitzen vier Notch-Proteine (Übersicht: Fortini, 2009).

1.3.1 Die Proteinstruktur von Notch

Notch-Rezeptoren sind große, heterodimere Transmembranproteine des Typ I, welche die Membran nur einmal passieren (D'Souza, Miyamoto & Weinmaster, 2008). Die extrazelluläre Domäne aller Notch-Proteine („notch extracellular domain“, NECD) enthält 29 bis 36 aneinandergereihte „epidermal growth factor (EGF)-like repeats“, die bereits im Golgi-Apparat von „O-Fut“ („O-fucosyl transferase“), „Rumi“ und „Fringe“ glykosyliert werden. Einige der „EGF-like repeats“ vermitteln die Interaktion mit Notch-Liganden auf benachbarten Zellen (*trans*-Interaktion), was zur Signaltransduktion führt. Andere „EGF-like repeats“ sind dafür verantwortlich, dass Interaktionen mit Liganden auf der gleichen Zelle zu einer *cis*-Inhibition führen (Übersicht: Kopan & Ilagan, 2009). Auf die „EGF-like repeats“ folgt eine negativ regulierende Region (NRR), die aus drei cysteinreichen „Lin12-Notch repeats“ (LNR) und einer Heterodimerisierungsdomäne (HDD)

besteht. Die NRR verhindert eine Aktivierung des Rezeptors in der Abwesenheit eines Liganden. Die HDD entsteht durch die Prozessierung des Notch-Rezeptors im Golgi-Apparat durch Furin (S1) und anschließende nicht kovalente Interaktion des N- und C-Terminus der beiden Fragmente. An die einfache Transmembrandomäne (TMD) reiht sich intrazellulär das RBP-Jk Assoziationsmodul (RAM), das aus ca. 100 Aminosäuren besteht (Tamura et al., 1995) und ein Tryptophan-Aminosäure X-Prolin Motiv („WxP“) enthält. Dieses Motiv ist stark konserviert (Kovall & Hendrickson, 2004) und für die CBF1-Interaktion essentiell (Johnson, Ilagan, Kopan & Barrick, 2010). Die RAM-Domäne wird über eine unstrukturierte Region, die ein NLS (nukleäres Lokalisationssignal) enthält, mit sieben Ankyrin-Wiederholungen (ANK) verbunden. Darauf folgen erneut ein NLS sowie eine grob definierte Transaktivierungsdomäne (TAD). Der C-Terminus von Notch-Rezeptoren besteht aus einem konservierten prolin-, glutamin-, serin- und threonin-reichen Motiv (PEST), welche die Signalsequenz zur Ubiquitinierung beinhalten, die für die Degradation des intrazellulären Notch-Fragments (Notch-IC) durch das Proteasom notwendig ist (Fryer, White & Jones, 2004; O'Neil & Look, 2007).

Die dreidimensionale Struktur von Notch wurde zunächst nur für die intrazellulären Domänen RAM und ANK in Verbindung mit dem DNA-Bindeadapter CBF1 und einem Fragment des Hes-Promotors veröffentlicht (Nam et al., 2006; Wilson & Kovall, 2006). Dabei konnte einerseits gezeigt werden, dass das Protein MAML1 („mastermind-like protein 1“) die Bindung von CBF1 und Notch wie eine Klammer stabilisiert (Nam et al., 2006). Andererseits wurde anhand der Kristallstruktur genau dargestellt, wie das WxP-Motiv von Notch, das sich in der RAM-Domäne befindet, in die hydrophobe Bindetasche von CBF1 bindet (Wilson & Kovall, 2006). Durch „yeast-two-hybrid“-Experimente wurde gezeigt, dass auch die Bindetasche flankierende Aminosäuren von Bedeutung für die Bindung sind. Die CBF1/Notch-Interaktion wird inhibiert, wenn innerhalb von CBF1 die Aminosäuren F235I oder K249M (Fuchs et al., 2001) substituiert werden.

Die Bindungsstärke der Interaktion von CBF1 und Notch wurde mehrfach beschrieben und hat in ITC („isothermal titration calorimetry“-)Experimenten, abhängig von dem verwendeten Proteinfragment, einen K_d -Wert zwischen 20 nM und 2 μ M (Del Bianco, Aster & Blacklow, 2008; Friedmann et al., 2008; Johnson et al., 2010; Lubman, Ilagan, Kopan & Barrick, 2007). Die Interaktion eines Peptids der RAM-Domäne, welches das WxP-Motiv enthält, mit CBF1 hat einen hohen K_d -Wert von ca. 72 nM. Sobald das WxP-Motiv in diesem Peptid deletiert wird, kann auch keine Interaktion mehr nachgewiesen werden (Johnson et al., 2010). Werden andererseits die von Fuchs et al. definierten Aminosäuren von CBF1, welche für die Notch-Interaktion notwendig sind, mutiert, so kann auch mit ITC-Messungen keine Bindung des Notch-Peptids mit WxP-Motiv detektiert werden (Johnson et al., 2010).

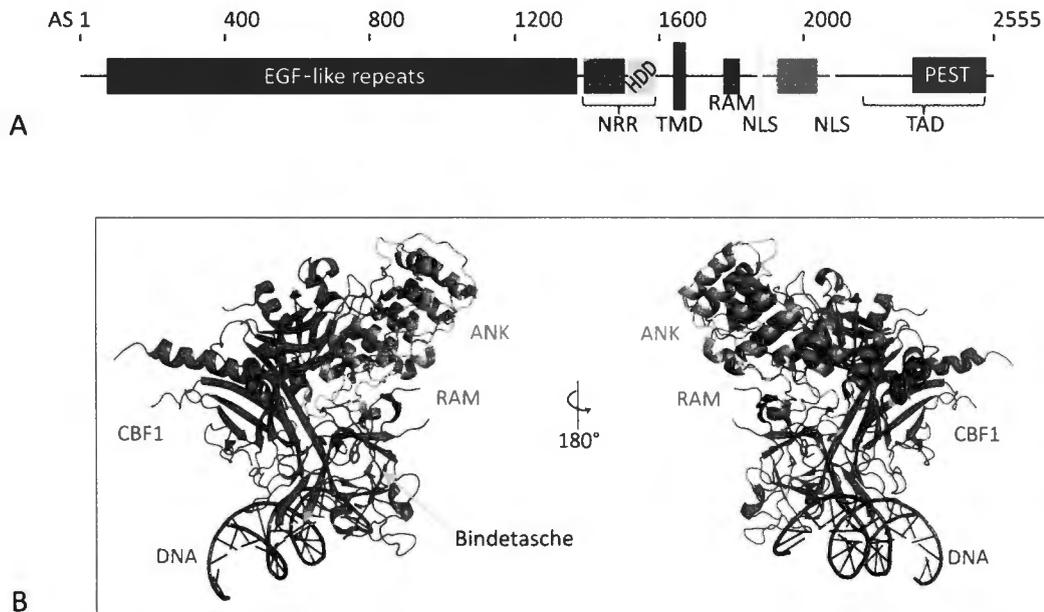


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Notch-Domänen und Kristallstruktur von RAM und ANK während der CBF1-Bindung

(A) Das humane Notch 1 Protein besteht extrazellulär aus 36 „epidermal growth factor (EGF)-like repeats“, die für die Ligandeninteraktion wichtig sind und der „negative regulatory region“ (NRR), die sich aus drei Cystein-reichen Lin12/Notch Wiederholungen (LNR) und der Heterodimerisierungsdomäne (HDD) zusammensetzt. Die Transmembrandomäne (TMD) passiert die Membran nur einmal. Intrazellulär folgen das RBPjk (CBF1) Assoziationsmodul (RAM), welches das Tryptophan-Aminosäure X-Prolin Motiv enthält, das für die CBF1-Interaktion notwendig ist und die sieben Ankyrin Wiederholungen (ANK), welche die CBF1-Bindung stabilisieren und von zwei nukleären Lokalisierungssignalen (NLS) flankiert werden. Der C-Terminus besteht aus einer Transaktivierungsdomäne (TAD) und einem konservierten prolin-, glutamin-, serin- und threonin-reichen Motiv (PEST), das für die Degradierung von Notch-IC notwendig ist. (B) Die Domänen RAM (pink) und ANK (grün) von Notch wurden im Komplex mit CBF1 (blau) und DNA (grau) von Nam 2006 und Wilson 2006 veröffentlicht (Nam et al., 2006; Wilson & Kovall, 2006). Die Aminosäuren Tryptophan und Prolin von RAM, hier als „sticks“ dargestellt, befinden sich in der hydrophoben Tasche, welche die BT-Domäne von CBF1 ausbildet.

1.3.2 Die Notch-Signalwege

Es gibt zwei unterschiedliche Arten des Notch-Signalweges. Der kanonische Notch-Signalweg, der von CBF1 und Notch-IC abhängig ist und der nicht kanonische Signalweg, der ohne CBF1 oder Notch erfolgen kann. Beide Signalwege sollen im Folgenden kurz erklärt werden.

Der **kanonische Notch-Signalweg** ist an der Regulation von Proliferation, Apoptose und Differenzierung beteiligt. Daher ist er sowohl während der Entwicklung von Organismen als auch für den Erhalt von Geweben von großer Bedeutung (Artavanis-Tsakonas, Rand & Lake, 1999). Durch die Bindung eines Notch-Liganden der DSL-Familie (Delta, Serrate / Jagged in *D.melanogaster* und Säugern sowie Lag-2 in *C. elegans*) an die „EGF-like repeats“ des Notch-Rezeptors, wird der kanonische Signalweg induziert. Die Interaktion mit dem Liganden exponiert eine Schnittstelle (S2) für die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne NECD durch die Metalloproteasen ADAM10 (containing a disintegrin and metalloprotease) oder TACE („TNF-α-converting enzyme“) (Übersicht: Zolkiewska, 2008), so dass eine membranverankerte, aktivierte Form von Notch, NEXT („Notch extracellular truncation“) genannt, entsteht. NEXT dient als Substrat für einen γ -Sekretase-Komplex und wird zweimal in den Schnittstellen S3 und S4 in der Transmembranregion geschnitten, so dass ein kurzes Peptid und Notch-IC ins Zytoplasma entlassen wird (Übersicht: Fortini, 2009; Übersicht: Kopan & Ilagan, 2009; Kovall, 2008). Schließlich kann Notch-IC in den Zellkern gelangen, wo es über seine ANK- und RAM-Domänen und dem darin enthaltenen Bindemotiv WxP mit CBF1 und MAML1 interagiert (Ilagan, Lim, Fulbright, Piwnica-Worms & Kopan, 2011; Nam et al., 2003). Die CBF1/Notch-IC-Interaktion hat zur Folge, dass an CBF1 gebundene Repressorkomplexe verdrängt und Notch-Zielgene induziert werden (Übersicht: Fortini, 2009; Übersicht: Kopan & Ilagan, 2009; Kovall, 2008). Phosphorylierung von Notch-IC durch GSK-3 β und CDK8 reguliert die Lebenszeit von Notch-IC und Ubiquitinierung der PEST-Region durch E3 Ligasen führt zur Degradierung im Proteasom (Fryer et al., 2004).

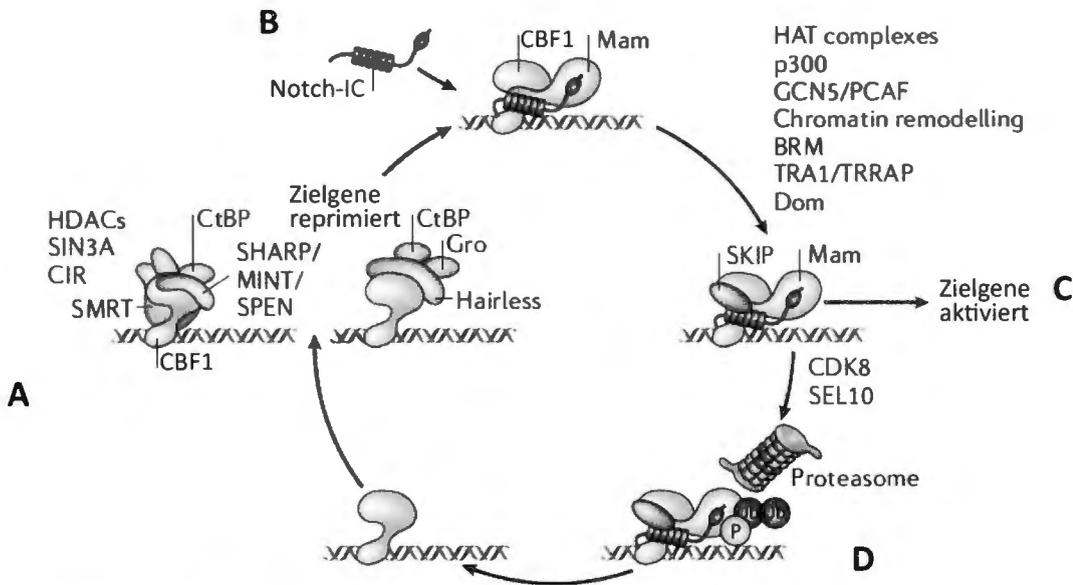


Abbildung 3: Der kanonische Notch-Signalweg (modifiziert aus Bray, 2006)

(A) CBF1 wird konstitutiv exprimiert, bindet an DNA und rekrutiert Repressorkomplexe, so dass die Transkription von Zielgenen reprimiert wird. (B) Nach der Translokation von Notch-IC in den Nucleus, bindet Notch-IC zusammen mit MAM an CBF1 und verdrängt dabei die an CBF1 gebundenen Repressorkomplexe. (C) Nun können weitere Proteine binden und deren Beitrag führt zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen. (D) Die Ubiquitinierung und Phosphorylierung der PEST-Region von Notch-IC führt zur Degradation durch das Proteasom, so dass der Aktivierungskomplex aufgelöst wird und CBF1 wieder frei ist für die Bindung von Repressorkomplexen.

Der **nicht kanonische Notch-Signalweg** ist von der Beteiligung von CBF1 oder Notch unabhängig und wird in drei Typen unterteilt. Typ I erfordert, wie der kanonische Signalweg, die Induktion durch einen Liganden und ist abhängig von Notch-IC. Allerdings interagiert Notch-IC nicht mit CBF1, sondern mit gewebespezifischen Co-Aktivatoren oder Komponenten anderer Signalwege, z.B. β -Katenin aus dem Wnt-Signalweg, um Zielgene zu aktivieren. Der nicht kanonische Signalweg vom Typ I ist an der Differenzierung von Nervenzellen, der Proliferation von haematopoetischen Vorläuferzellen und dem „Lineage commitment“ von B-Zellen beteiligt. Aber auch die Inhibition von Apoptose, die neoplastische Transformation und das Wachstum von Tumoren werden als Effekte des nicht kanonischen Notch-Signalwegs betrachtet. Der nicht kanonische Signalweg vom Typ II ist ebenfalls CBF1-unabhängig. Er erfordert zudem keine Spaltung des Notch-Rezeptors durch γ -Sekretasen. Dieser Signalweg ist in die transiente Proliferation von Vorläuferzellen involviert. Beim letzten Signalweg vom Typ III ist die Signaltransduktion abhängig von CBF1 und unabhängig von Notch. Diese Art der nicht

kanonischen Signaltransduktion wurde im Zusammenhang mit der Proliferation von Neuroblastomen und der Differenzierung von GABAergen Neuronen beschrieben (Übersicht: Sanalkumar, Dhanesh & James, 2010). Die molekularen Mechanismen, die zur Beeinflussung von Signalwegen durch die drei unterschiedlichen Formen des nicht kanonischen Notch-Signalweges führen, sind allerdings nicht so gut beschrieben wie der kanonische Notch-Signalweg. Es werden unter anderem der NF κ B-, der JNK- und auch der Wnt-Signalweg beeinflusst. Innerhalb des Wnt-Signalweges ist β -Katenin eine wichtige Komponente, die CBF1-unabhängig durch Bindung an Notch-IC reguliert wird (Übersicht: Andersen, Uosaki, Shenje & Kwon, 2012). Innerhalb des NF κ B-Signalweges kann Notch-IC die Aktivität von NF- κ B verstärken, indem es NF- κ B im Kern zurückhält. Es ist allerdings nicht bekannt, welche Domäne von Notch-IC für diesen Effekt notwendig ist (Shin, H. M. et al., 2006). Der JNK-Signalweg kann durch membrangebundenes Notch (Typ II) beeinflusst werden, wobei die ANK-Domäne innerhalb von Notch dafür essentiell ist (Zecchini, Brennan & Martinez-Arias, 1999).

1.3.3 Notch-assoziierte Krankheiten

Notch-IC-Fragmente aller vier Notch-Homologe haben sowohl *in vitro* als auch in Tiermodellen eine onkogene Wirkung. So führt die Expression von Notch-IC in haematopoetischen Vorläuferzellen zu T-Zell Lymphomen oder verursacht Brusttumore in Mäusen (Übersicht: Miele, 2006). Deletionen der NECD oder aktivierende Mutationen von Notch sind in ca. 50% der T-Zell akuten lymphoblastischen Leukämien (T-ALL) vorherrschend. Diese Mutationen betreffen vor allem die HDD, so dass die Abspaltung der NECD vereinfacht wird, oder die PEST-Region, so dass die Lebenszeit von Notch-IC verlängert wird (Weng et al., 2004). Aktivierende Notch-Mutationen wurden auch in einer Vielzahl von soliden Tumoren beobachtet, wie zum Beispiel Tumoren in Gebärmutter, Prostata, Nieren, Kolon, Leber, Pankreas, Lunge und Brust (Übersicht: Wang, Z., Li & Sarkar, 2010).

Bisher haben mehrere Studien die Inhibition des Notch-Signalweges als Strategie zur Krebstherapie vorgeschlagen. Es gibt sowohl Therapievorschläge die spezifisch Notch targetieren, wie monoklonale Antikörper und RNA-Interferenz, als auch unspezifische Ansätze wie lösliche und unlösliche Notch- oder MAML1-Köder sowie Inhibitoren der γ -Sekretase (GSI) (Übersicht: Miele, 2006). γ -Sekretase-Inhibitoren können *in vitro* einen Wachstumsarrest von T-ALL Zelllinien bewirken und zeigen auch *in vivo* in Klinischen Studien der Phase I erste Erfolge. Allerdings ist die γ -Sekretase an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt, so dass auch weitere

Signalwege durch die Behandlung mit GSI beeinträchtigt werden (Übersicht: Wang, Z. et al., 2010).

1.4 Das Epstein-Barr-Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA2)

Das Epstein-Barr-Virus nukleäre Antigen 2 (EBNA2) agiert bei der Immortalisierung und B-Zelltransformation sowie bei der EBV-Infektion als Schlüsselprotein (Cohen, Wang, Mannick & Kieff, 1989). Es wird zusammen mit EBNA-LP als eines der ersten Proteine nach der EBV-Infektion exprimiert (Rooney, Howe, Speck & Miller, 1989). EBNA2, nicht aber EBNA-LP, ist für die Genexpression der latenten EBV-Proteine essentiell und reguliert ebenfalls zelluläre Gene, so dass das Transkriptionsprogramm aktivierter B-Zellen ausgenutzt werden kann (Übersicht: Kuppers, 2003).

1.4.1 Das Protein EBNA2

Das Protein EBNA2 des EBV-Stamms B95.8 hat im denaturierten Zustand ein apparentes Molekulargewicht von 87 kDa. Es besteht aus 487 Aminosäuren (AS) und beinhaltet mehrere funktionelle Domänen. EBNA2 hat die Fähigkeit zu dimerisieren und Oligomere zu bilden (Tsui & Schubach, 1994). In diesem Zusammenhang wurden bisher zwei Dimerisierungsdomänen (DIM) beschrieben. Die eine besteht aus den Aminosäuren 1-58 des N-Terminus und die andere liegt zwischen den Aminosäuren 89 und 210 (Gordadze et al., 2004; Harada, Yalamanchili & Kieff, 2001). Zwischen den DIM liegt eine prolinreiche Region („polyP“) (Gordadze, Poston & Ling, 2002). Für die Transkriptionsregulation ist EBNA2 auf Adapterproteine angewiesen, da es selbst nicht an DNA binden kann. Die Region, die für die Interaktion mit DNA-Adaptoren notwendig ist, befindet sich zwischen den Aminosäuren 284-341 und beinhaltet das stark konservierte WxP-Motiv Tryptophan-Aminosäure X-Prolin. Dieses Bindemotiv ist sowohl für die CBF1/EBNA2- als auch die CBF1/Notch-Interaktion essentiell und daher für die Fragestellung dieser Arbeit besonders wichtig (Übersicht: Kempkes, 2010). Die darauf folgenden Arginin-Glycin Wiederholungen (RG) sind möglicherweise für die Interaktion mit weiteren Proteinen oder DNA notwendig. Eine Deletion dieser Region führt zu geringer Transformationseffizienz durch EBV und einem stark beeinträchtigten Zellwachstum *in vitro* (Tong, Yalamanchili, Harada & Kieff, 1994). Der C-Terminus beinhaltet eine Transaktivierungsdomäne (TAD, AS 426-483), welche für die Transkriptionsaktivierung durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren notwendig ist (Tong, Drapkin, Reinberg & Kieff, 1995) und ein NLS enthält. Ein Vergleich der EBNA2-Varianten von

EBV Typ1 und Typ2, sowie dem Herpesvirus Papio führte zur Definition der konservierten Regionen (CR) (Ling, Ryon & Hayward, 1993). Alle funktionellen Domänen und konservierten Regionen (CR) sind in Abbildung 4 dargestellt.

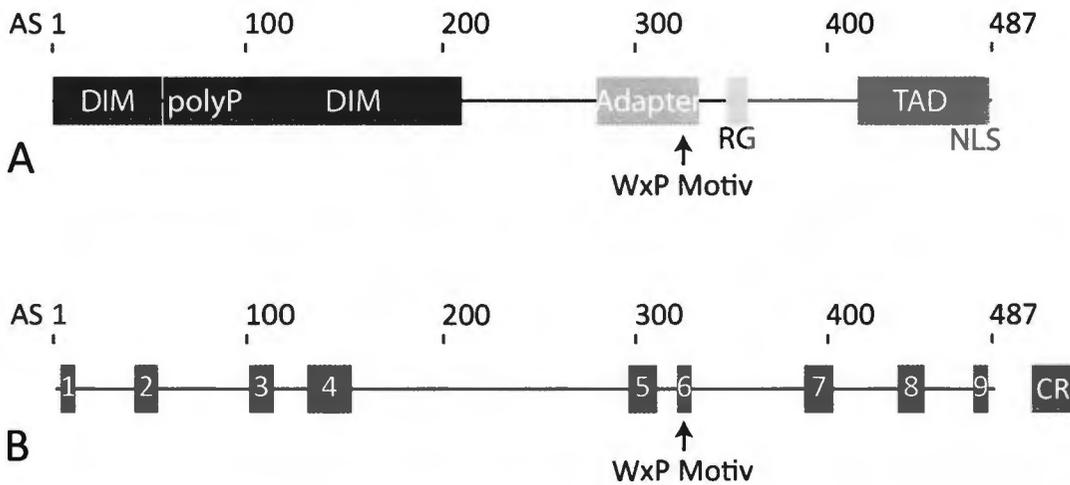


Abbildung 4: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen und konservierten Regionen von EBNA2

(A) Dargestellt sind die Dimerisierungsdomänen (DIM, AS 1-58 und AS 89-210), die prolinreiche Region (polyP, AS 60-100) und eine Adapter-Region, die für die Bindung von EBNA2 an Promotoren mit Hilfe von DNA-Adaptoren wichtig ist (AS284-341). In dieser Adapter-Region befindet sich das WxP-Motiv, das für die Bindung an den DNA-Adapter CBF1 essentiell ist. Hinzu kommen eine Wiederholung der Aminosäuren Arginin und Glycin (RG, AS 341-356), eine Transaktivierungsdomäne (TAD, AS 426-483) und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS, AS 468-487). (B) Die konservierten Regionen (CR) 1-9 wurden durch einen Vergleich von EBV Typ1 und Typ2, sowie dem Herpesvirus Papio definiert.

Von Fuchs et al. wurden mittels „yeast-two-hybrid“-Experimenten definiert, welche Aminosäuren von CBF1 für die Interaktion mit EBNA2 notwendig sind. Dabei war es möglich, durch Mutationen die Bindung von Notch zu verhindern, ohne die CBF1/EBNA2-Interaktion zu stören und andererseits auch die Bindung von EBNA2 zu verhindern, ohne die CBF1/Notch-Interaktion zu hemmen (Fuchs et al., 2001). In Abbildung 5 ist die Oberflächenstruktur der BT-Domäne (beige) und des Notch-Peptids (gelb) mit dem WxP-Motiv („sticks“) dargestellt (aus Johnson et al., 2010). Die Aminosäuren F235 (Phenylalanin) und K249 (Lysin) sind für die Notch-Bindung essentiell und rot markiert. Die Aminosäure Glutamin (Q307) ist grau markiert und für die EBNA2-Bindung essentiell (Fuchs et al., 2001; Johnson et al., 2010).

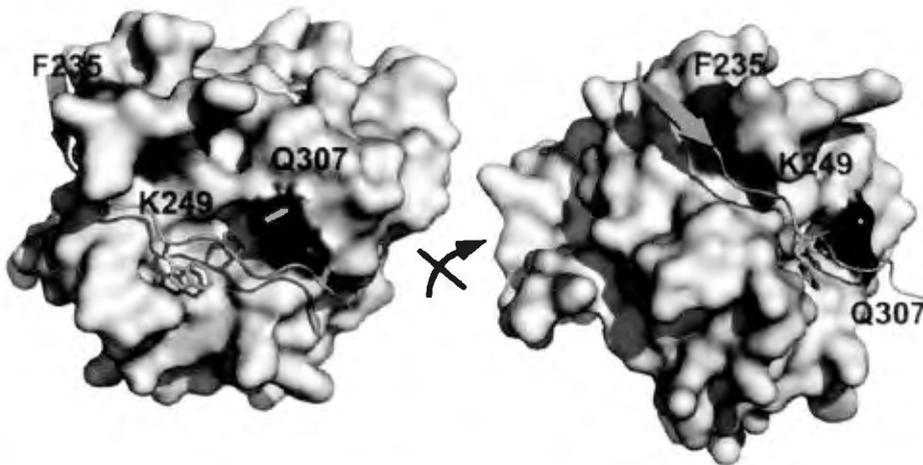


Abbildung 5: Struktur von CBF1-BTD („beta-trefoil domain“) mit dem Notch-Peptid (aus Johnson et al., 2010)

Abgebildet ist die Oberflächenstruktur der BTD-Domäne von CBF1 (beige) und die Bindung des Notch-Peptids (gelb). Die Aminosäuren F235 (Phenylalanin) und K249 (Lysin) in Rot sind essentiell für die Notch-Interaktion. Die Aminosäure Q307 (Glutamin) in Grau ist essentiell für die EBNA2-Bindung.

Aufgrund dieser Unterschiede wäre eine Substanz, welche die Aminosäuren F235 oder K249 maskiert, im Stande, die Bindung von Notch an CBF1 zu inhibieren, ohne die EBNA2-Bindung zu beeinträchtigen. Andererseits könnte die Blockade der Aminosäure Q307 die CBF1/EBNA2-Interaktion verhindern, ohne die CBF1/Notch-Interaktion zu hemmen. Dieser Unterschied sollte eine differentielle Inhibition der CBF1/Notch- und CBF1/EBNA2-Interaktion ermöglichen. Zusätzlich unterscheiden sich die CBF1/Notch- und die CBF1/EBNA2-Interaktion in ihren Bindekonstanten. Die Interaktion von CBF1 mit einem EBNA2-Peptid, welches das WxP-Motiv enthält, hat einen K_d -Wert von ca. $4,6 \mu\text{M}$ in ITC („isothermal titration calorimetry“)-Experimenten (Johnson et al., 2010). Im Vergleich dazu, hat die Interaktion von CBF1 und Notch einen K_d -Wert von ca. 72 nM . Die Bindung von EBNA2 an CBF1 ist folglich ca. 70-fach schwächer als die Bindung von Notch und CBF1.

1.4.2 Funktionen von EBNA2

EBNA2 ist ein Transkriptionsaktivator, der, wie bereits erwähnt, nicht selbst mit der DNA interagieren kann, sondern DNA-Bindeadapter wie CBF1 benötigt (Übersicht: Kempkes, 2010). In EBV-infizierten B-Zellen werden der virale C-Promotor (Cp), der die Transkription der EBNA-Gene

reguliert, sowie die Promotoren der viralen Gene LMP1, LMP2A und LMP2B durch EBNA2 transaktiviert (Abbot et al., 1990; Fahraeus, Jansson, Ricksten, Sjoblom & Rymo, 1990). Mittlerweile ist auch bekannt, dass sowohl CBF1 als auch EBNA2 nicht nur in Promotorbereichen von ca. 2kb jenseits des Transkriptionsstarts an die DNA binden, sondern zu einem Großteil in zu dem Promotor distalen Bereichen zwischen den Genen, UTR („untranslated region“), Introns und Exons (Zhao, B. et al., 2011). Die Transaktivierung der viralen EBNA2-Zielgene ist allerdings nicht ausschließlich abhängig von CBF1. In den Promotorbereichen der viralen Zielgene sind jeweils noch Bindestellen für weitere DNA-Bindeadapter vorhanden. Der LMP1-Promotor hat zusätzlich eine PU.1-Binderegion (Johannsen et al., 1995; Laux, Adam, Strobl & Moreau-Gachelin, 1994), der Cp hat eine CBF2/AUF1-Binderegion (Fuentes-Panana & Ling, 1998; Fuentes-Panana, Peng, Brewer, Tan & Ling, 2000; Fuentes-Panana, Swaminathan & Ling, 1999) und der LMP2-Promotor besitzt zwei Bindestellen für CBF1 (Meitinger, Strobl, Marschall, Bornkamm & Zimmer-Strobl, 1994; Zimmer-Strobl et al., 1994), durch die EBNA2 an den Promotorbereich binden und die Expression dieser Gene regulieren kann. EBNA2 ist allerdings auch für die Transkriptionsmodulation von zellulären Genen verantwortlich und assoziiert dafür hauptsächlich mit CBF1 und EBF („early b-cell factor“), aber auch mit ETS („E-twenty six“), RUNX („runt-related transcription factor“), NF- κ B, RelA oder PU.1, die wie von Zhao et al. beschrieben nicht nur in den Promotorbereichen an die DNA binden können (Zhao, B. et al., 2011). Beispiele für primäre zelluläre Zielgene von EBNA2 sind CD21 und CD23 (Cordier et al., 1990; Wang, F., Petti, Braun, Seung & Kieff, 1987), die beide Marker für aktivierte B-Zellen darstellen. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7, der an der Migration von B- und T-Zellen in die lymphatischen Organe beteiligt ist, wird ebenfalls durch EBNA2 beeinflusst (Maier et al., 2005; Maier et al., 2006). Außerdem kann EBNA2 das Protoonkogen *c-Myc*, das an der Entstehung vieler Tumore beteiligt ist, direkt induzieren (Kaiser et al., 1999; Slack & Gascoyne, 2011). Die Transaktivierung des LMP1-Promotors ist von einer Dimerisierung des Proteins EBNA2 abhängig (Gordadze et al., 2004). Es ist jedoch unbekannt, ob dieser Mechanismus auch bei anderen EBNA2-Zielgenen notwendig ist. Die CBF1-Abhängigkeit der Transaktivierung und die Tatsache, dass EBNA2 ein Schlüsselprotein für die Transformation und Immortalisierung von B-Zellen ist, macht das Zusammenwirken dieser Proteine als Angriffspunkt für einen möglichen Therapieansatz sehr interessant.

EBNA2 und Notch zeigen nicht nur das WxP-Motiv für die CBF1 Bindung als Gemeinsamkeit. Sie sind auch dazu in der Lage, einige Zielgene des jeweils anderen Proteins zu induzieren (Zimmer-Strobl & Strobl, 2001).

1.5 Inhibitoren von Protein/Protein-Interaktionen

In den letzten Jahrzehnten konnte eine Vielzahl von Signalwegen immer genauer erforscht werden, so dass auch ihre Beteiligung und das Zusammenspiel bei der Entstehung von Krankheiten wie z.B. Tumorerkrankungen immer besser verstanden werden. Außerdem ermöglichte der Fortschritt in der kombinatorischen Chemie die schnelle Generierung von neuen chemischen Verbindungen. Diese Entwicklungen führten dazu, dass in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie „high throughput screening“ (HTS)-Methoden ein wichtiger Bestandteil des Prozesses für die Identifizierung von Inhibitoren wurden. Das bedeutet, dass die Wirkung von einer großen Anzahl an Substanzen mittels Automatisierung in kurzer Zeit überprüft wurde (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011). Die Wahl der möglichen Angriffspunkte beschränkte sich zunächst auf enzymatische Reaktionen und Rezeptor/Ligand-Interaktionen (z.B. „G-protein coupled receptor“, GPCR), die eine gute „chemical tractability“ aufweisen. Für Zielstrukturen die eine gute „chemical tractability“ aufweisen, ist es möglich, eine medizinisch relevante Substanz, die den gewünschten Effekt auf die Zielstruktur hat, durch den HTS einer „small molecule“-Bank zu identifizieren. Protein/Protein-Interaktionen (PPIs) erschienen zunächst aufgrund ihrer großen Oberflächen und dem Mangel an Bindetaschen als ungeeignete Ziele für Inhibitoren (Übersicht: Buchwald, 2010). Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass PPIs auf sogenannten „hot spots“, also der Interaktion von wenigen essentiellen Aminosäuren innerhalb der Kontaktfläche, beruhen. Die Struktur dieser „hot spots“ ist konserviert. Sie bestehen aus Bindetaschen mit einem Mosaik aus hydrophoben und polaren Regionen (Kozakov et al., 2011). PPIs sind sehr interessante Zielstrukturen, da sie einen wichtigen Bestandteil von (deregulierten) Signalkaskaden bilden. Inhibitoren von PPIs (PPII) können orthosterisch sein und damit direkt die essentiellen „hot spots“ der Interaktion blockieren. Sie können auch allosterisch sein, d.h. sie binden in einem anderen Bereich des Proteins, verursachen jedoch eine Konformationsänderung, welche die Interaktion mit dem Liganden verhindert (Übersicht: Buchwald, 2010).

1.5.1 Antikörper als Inhibitoren von Protein/Protein-Interaktionen

Köhler und Milstein haben bereits 1975 gezeigt, dass spezifische Antikörper in Hybridomzelllinien aus Myelomzellen und Milzzellen einer immunisierten Maus hergestellt werden können (Kohler & Milstein, 1975). Bereits 1987 wurde der erste therapeutische Antikörper zur Behandlung von Transplantationspatienten, die unter akuter Organabstoßung leiden, zugelassen. Seither werden mehr als 25 Antikörper in der klinischen Therapie verwendet

und viele weitere entwickelt (Übersicht: An, Z., 2010). Heute werden chimäre oder humanisierte Antikörper eingesetzt, um eine Immunantwort gegen Mausantikörper zu verhindern. In chimären Antikörpern sind die variablen Regionen mit den „complementarity determining regions“ (CDR), die für die Bindung des Antigens notwendig sind, von der Maus. Humanisierte Antikörper beinhalten nur noch CDRs von der Maus (Übersicht: An, Z., 2010). Ein hier bereits erwähntes Beispiel für chimäre Antikörper ist Rituximab, der CD20 bindet und unter anderem für die Behandlung von PTLD verwendet wird (Choquet et al., 2007). Therapeutische Antikörper werden vor allem zur Behandlung von Tumorerkrankungen sowie von AIID („Arthritis, immune and inflammatory disorder“) verwendet. Allerdings können nur extrazelluläre Proteine, Liganden und Zytokine blockiert werden, da Antikörper Zellmembranen ohne vorhergehende Permeabilisierung nicht passieren können. Außerdem verursacht die Produktion von Antikörpern hohe Kosten und die orale Verabreichung ist problematisch (Übersicht: Arkin et al., 2003).

1.5.2 „Small molecules“ als Inhibitoren von Protein/Protein-Interaktionen

Mit der Isolation und Generierung von Tausenden von chemischen, organischen Substanzen stellte sich die Frage, welche Anforderungen diese erfüllen sollten, damit sie als Medikament oder Leitstruktur für ein Medikament verwendet werden können („drug-likeness“). Es gibt unterschiedliche Methoden, um die „drug-likeness“ vorherzusagen (Übersicht: Walters, Ajay & Murcko, 1999). Von Lipinski und seiner Gruppe wurden die chemischen Eigenschaften von 2245 Molekülen mit bereits beschriebener Indikation verglichen, um zu untersuchen, welche Kriterien (Deskriptoren) erfüllt werden müssen, damit eine chemische Verbindung nach oraler Administration an ihren Zielort gelangen kann („orally bioavailable“). Ca. 90% der untersuchten Medikamente haben die in Tabelle 2 gelisteten „Lipinski rule of five“ erfüllt (Lipinski, C. A., Lombardo, Dominy & Feeney, 2001).

Deskriptor	
Molekulargewicht	≤ 500 Da
Donoren für Wasserstoffbrückenbindungen	≤ 5
Akzeptoren für Wasserstoffbrückenbindungen	≤ 10
LogP (berechneter Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient)	≤ 5

Tabelle 2: Kriterien der „Lipinski rule of five“

Die Autoren erklären, dass diejenigen 10% der Medikamente, welche gegen die „Lipinski rule of five“ verstoßen, aufgrund von funktionellen Gruppen trotzdem „orally bioavailable“ wären (Lipinski, C. A. et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit, um die „drug-likeness“ zu bestimmen, ist die Definition der Lage eines Moleküls innerhalb des „chemical space“ (Walters et al., 1999). „Chemical space“ steht für das Universum und jedes Molekül stellt einen Stern innerhalb dieses Universums dar. Um die Position jedes Moleküls zu ermitteln, werden unterschiedliche Deskriptoren, wie z.B. das Molekulargewicht, die Wasserlöslichkeit und weitere topologische Merkmale bestimmt (Dobson, 2004). Anhand dieser Deskriptoren, können die chemischen Substanzen in Gruppen zusammengefasst und innerhalb des „chemical space“ platziert werden. In Abbildung 6 ist ein Modell des „chemical space“ als blauer Würfel dargestellt. Diskrete Bereiche („space“), die von chemischen Substanzen mit übereinstimmenden Deskriptoren eingenommen werden, sind farbig markiert (Proteasen violett, GPCRs blau und Kinasen rot). Die unabhängige Gruppe von Molekülen, welche „drug-like“ sind, da sie in den ADME („absorption of the drug from the blood, distribution of the drug in the body, metabolism of the drug over time and excretion of the drug“) Kriterien übereinstimmen, ist grün markiert. Die Deskriptoren der chemischen Substanzen, die sich im ADME „space“ befinden, stimmen mit den Deskriptoren von Medikamenten überein (Übersicht: Lipinski, C. & Hopkins, 2004).

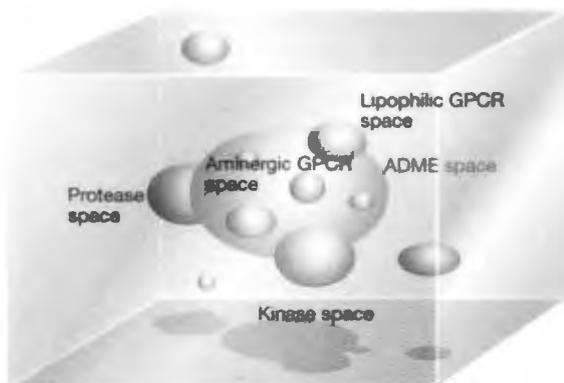


Abbildung 6: Das „chemical space“-Modell nach Lipinski und Hopkins (Übersicht: Lipinski, C. & Hopkins, 2004)

Das „chemical space“ ist als blauer Würfel dargestellt und die Bereiche, welche von Molekülen mit spezifischen Bindeaffinitäten eingenommen werden, sind farbig gekennzeichnet. Chemische Substanzen, die Proteasen binden, befinden sich im Protease „space“ (violett). Kinase-bindende Moleküle sind im roten Bereich und GPCR-bindende Substanzen in den blauen Bereichen. Die Position von Substanzen mit „drug-like“

Eigenschaften, welche die ADME („absorption, distribution, metabolism und excretion“)-Deskriptoren erfüllen, ist grün markiert.

Chemische Substanzen, die „drug-like“ sind, da sie die „Lipinski rule of five“ erfüllen oder sich innerhalb des ADME „space“ befinden, wurden unter der Bezeichnung „small molecule“ in Banken archiviert. Aufgrund der Bestimmung von „hot spots“ gelten ca. 30% der PPIs als potentielle Zielorte von „small molecule“-Inhibitoren (Hajduk, Huth & Tse, 2005). Es sind auch bereits einige „small molecule“ Inhibitoren von PPIs (PPII) identifiziert worden. Ein Beispiel für einen PPII von extrazellulären Zielstrukturen ist Maraviroc. Dieses „small molecule“ bindet irreversibel an den CCR5-Rezeptor, der für die Infektion mit HIV-1 notwendig ist. In zellbasierten Experimenten mit PBMC („peripheral blood mononuclear cell“) wurde die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Maraviroc bestimmt, die bei ca. 0,5 nM liegt (Dorr et al., 2005). Es war auch möglich, intrazelluläre PPIs mit „small molecules“ zu inhibieren. Die Interaktion von MDM2 mit p53 kann mit mehreren Substanzen gehemmt werden, die bereits für die therapeutische Anwendung weiterentwickelt werden und deren effektive Konzentrationen (EC_{50}) im unteren mikromolaren Bereich liegen (Übersicht: Kojima, Burks, Arts & Andreeff, 2010).

Es werden aber auch immer mehr organische Naturstoffe isoliert und in „small molecule“-Banken zur Verfügung gestellt. Nur ca. 50% der Naturstoffe erfüllen die Kriterien für „drug-like“ Substanzen, haben aber trotzdem gute pharmazeutische Eigenschaften. Ein Beispiel für einen solchen Naturstoff ist Rapamycin, das antiproliferativ und immunsuppressiv wirkt und als Inhibitor verwendet wird (Zhang, M. Q. & Wilkinson, 2007). Diese Substanz erfüllt drei der vier „Lipinski rule of five“ nicht, denn sie hat ein Molekulargewicht von ca. 912Da, 13 Akzeptoren für Wasserstoffbrückenbindungen und einen LogP von 6 (s. PubChem Compound ID: 5284616).

1.5.3 Hochdurchsatz-Methoden zur Identifizierung von Inhibitoren von Protein/Protein-Interaktionen

Prinzipiell kann jede Methode, mit der PPIs untersucht werden, auch als Methode zur Identifizierung von Hemmstoffen verwendet werden. Allerdings ist es nur dann möglich, „small molecule“-Banken im Hochdurchsatz auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten zu überprüfen („high throughput screening“, HTS), wenn das Testsystem auf kleinen Volumina basiert und kostengünstig durchgeführt werden kann. Jeder HTS-Prozess erfordert folgende Schritte (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011):

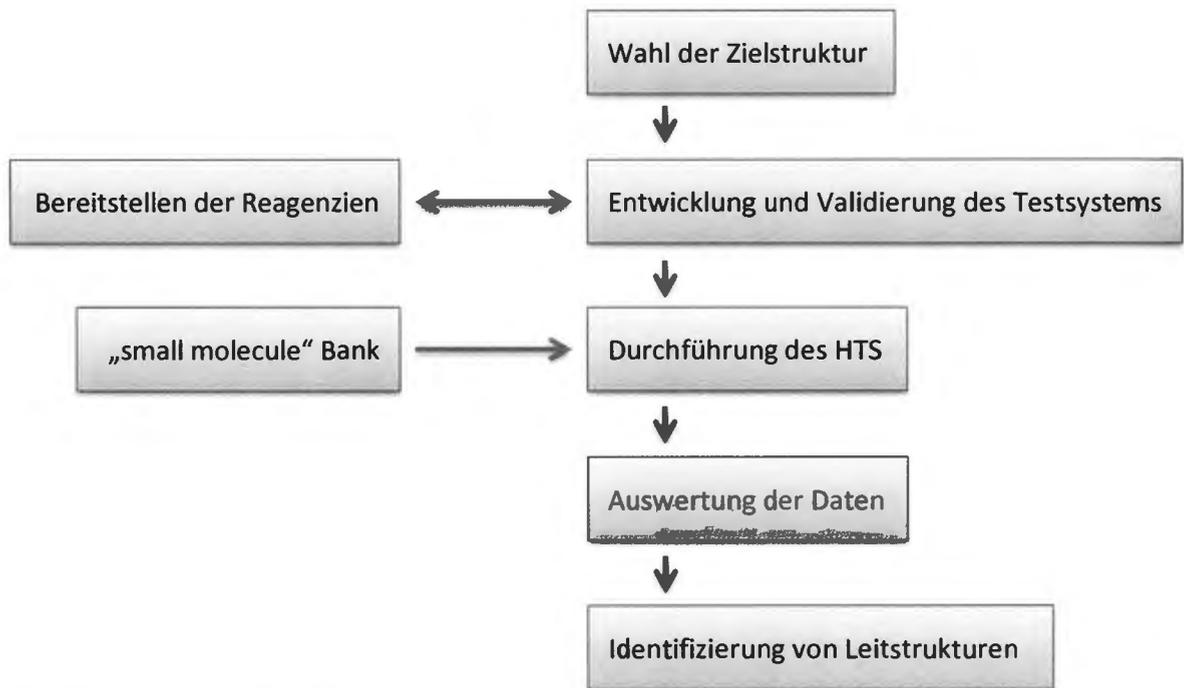


Abbildung 7: Schritte des „small molecule screens“ im Hochdurchsatzverfahren

1.5.3.1 Biochemische Testsysteme

In einem biochemischen Testsystem wird die Interaktion von „small molecules“ mit den isolierten Proteinen unter künstlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Das ermöglicht die direkte Identifizierung von Molekülen, welche die Bindung der beiden Interaktionspartner inhibieren. Allerdings besteht der Nachteil, dass nicht bekannt ist, ob die identifizierten PPIs membrangängig sind. Die derzeit verwendeten Methoden sind ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“), FPA („fluorescence polarization assay“), TR-FRET („time resolved fluorescence resonance energy transfer“), SPR („surface plasmon resonance“), α -screen, MS (Massenspektrometrie) und auch NMR („nuclear magnetic resonance“). Diese Methoden haben zur Identifizierung von „small molecule“-Inhibitoren von PPIs geführt. Allerdings haben sie alle sowohl Vor- als auch Nachteile, die bei der Wahl des Testsystems berücksichtigt werden sollten (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011).

1.5.3.2 Zellbasierte Testsysteme

Zellbasierte Methoden haben den Vorteil, dass keine spezifische Proteininteraktion bekannt sein muss, sondern vielmehr ein Signalweg gezielt und unter physiologischen Bedingungen gehemmt werden kann. Diese Testsysteme ermöglichen es, „small molecules“, welche die Membran nicht passieren können, sofort auszuschließen und gleichzeitig toxische Moleküle zu erkennen

(Übersicht: An, W. F. & Tolliday, 2010). Mit zellbasierten Testsystemen wird allerdings nicht gleichzeitig der Wirkmechanismus eines „small molecules“ bestimmt. Um den Wirkmechanismus zu untersuchen, sind weitere Experimente notwendig.

Eine häufig angewendete Methode für zellbasierte HTS sind „yeast-two-hybrid“-Experimente, die bereits zur Identifizierung von „small molecule“-Inhibitoren geführt haben (Übersicht: Colas, 2008). Es werden aber auch immer mehr auf humanen Zellen basierte Testsysteme verwendet (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011). Abhängig davon, welche Signalwege oder PPIs inhibiert werden, werden funktionelle Versuche, Reporter Assays oder Experimente, die Prozesse wie z.B. Zellmigration oder Zytokinese abfragen, durchgeführt (Übersicht: An, W. F. & Tolliday, 2010).

1.5.4 Kriterien für die Bewertung von Hochdurchsatz-Verfahren

Nach der Etablierung von spezifischen Testsystemen müssen diese zunächst validiert werden, bevor sie für einen „small molecule screen“ im Hochdurchsatz verwendet werden können. HTS-Prozesse erfolgen in 96-, 384- oder sogar 1536-Loch-Platten. Deshalb sollte sichergestellt sein, dass ein Testsystem mit einem oder mehreren dieser Formate kompatibel ist. Sowohl in biochemischen als auch zellbasierten Testsystemen ist es notwendig, deutlich messbare Signale zu erhalten, die spezifisch durch die PPI entstehen und sich vom Hintergrund unterscheiden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das zu inhibierende Signal nicht im gesättigten Bereich liegt, um eine Hemmung zu ermöglichen. Da die meisten „small molecule“-Banken in DMSO (Dimethylsulfoxid) als Lösungsmittel vorliegen, ist es notwendig, zu überprüfen, ob die spezifischen Signale und der Hintergrund durch Zugabe der Lösungsmittel beeinflusst werden. Nach der Etablierung gibt es mehrere Möglichkeiten, die Qualität des Testsystems zu bewerten. Die graphische Darstellung der Daten ermöglicht es, die Verteilung der Werte innerhalb einer Platte zu erkennen und dadurch systematische Fehler festzustellen. Statistische Analysen helfen, die Qualität unterschiedlicher Testsysteme auf der Basis von Mittelwerten und Standardabweichungen zu bewerten. Sie geben Auskunft über die Zuverlässigkeit der Methode unter den zuvor gewählten Reaktionsbedingungen (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011). Der Z'-Faktor wird aufgrund der Werte des maximalen Signals und des Hintergrundsignals berechnet und sehr häufig für die Validierung von Testsystemen verwendet (Zhang, J. H., Chung & Oldenburg, 1999). Eine weitere Möglichkeit ist die Berechnung des Signal-Windows, das auf den Werten des maximalen und halbmaximalen Signals basiert (Sittampalam, Kahl & Janzen, 1997).

Die Berechnung des Z'-Faktors und des Signal-Windows für die in dieser Arbeit etablierten Testsysteme ist in Kapitel 4.2.2 (s. S. 83) genau beschrieben.

1.6 Der Östrogenhormonrezeptor

Zwei Östrogenhormonrezeptoren, ER α und ER β , regulieren die östrogenabhängige Expression von Zielgenen. Dabei muss man zwischen dem genomischen und dem nicht-genomischen Signalweg unterscheiden. Der genomische Signalweg führt zur Regulation der Transkription von Zielgenen durch den intrazellulären Östrogenhormonrezeptor (ER). Östrogen, das die Biomembran ungehindert passieren kann, bindet an den ER. Die Bindung verursacht eine Konformationsänderung des ER, so dass dieser aus dem Komplex mit HSP90 („heat shock protein 90“) entlassen wird, dimerisiert und in den Nukleus transloziert. Dort kann der ER entweder durch direkte Bindung an EREs („estrogen responsive elements“) im Promotorbereich von Zielgenen oder durch Assoziation mit weiteren Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 oder Sp1, die Transkription von Zielgenen ohne EREs im Promotorbereich induzieren (Übersicht: Heldring et al., 2007). Der nicht-genomische Signalweg basiert auf einem membrangebunden ER, welcher nach Bindung von Östrogen ebenfalls dimerisiert. Dieser Signalweg führt zur schnellen Aktivierung von Kinase-Kaskaden wie ERK/MAP und PI3K (Übersicht: Levin, 2008). ER können in mehrere, aneinandergereihte Domänen unterteilt werden, die vom N- zum C-Terminus als Domänen A-F bezeichnet werden. Die Domäne E ist für die Bindung von Liganden wie Östrogen notwendig, vermittelt die Dimerisierung sowie die Bindung von Co-Faktoren und enthält ein NLS („nukleäres Lokalisationssignal“) (Übersicht: Shanle & Xu, 2010). In ihrer Funktion ist die Domäne E unabhängig von den weiteren Domänen des ER, so dass sie wie ein Modul benutzt werden kann (Picard, Salser & Yamamoto, 1988). Durch die Verwendung von chimären Proteinen der Domäne E des Östrogenrezeptors und E1A war es möglich, die Aktivität von E1A zu regulieren. Nur durch Zugabe eines Steroidhormons, ist es dem Fusionsprotein möglich in den Nukleus zu gelangen und die Transkription von Genen zu induzieren (Picard et al., 1988). Die Hemmung der Translokation wird durch die Bindung von Chaperonen wie HSP90 verursacht (Pratt & Toft, 2003). Die Tatsache, dass Fusionsproteine im Zytoplasma zurückgehalten werden und erst nach Zugabe eines Steroidhormones in den Nukleus gelangen können, auch wenn sie selbst ein NLS beinhalten, wurde für die Erforschung von einigen Proteinen ausgenutzt. So ermöglichte die Fusion der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors an das zelluläre Protoonkogen *c-Myc* die Untersuchung der Funktion dieses Proteins (Eilers, Picard, Yamamoto & Bishop, 1989). Auch die Funktion des EBV-Proteins EBNA2 wurde auf diese Weise genauer untersucht und die von

Maier beschriebenen Zellen wurden auch für Experimente in dieser Arbeit verwendet (Kempkes et al., 1995; Maier et al., 2005; Maier et al., 2006).

1.7 Fragestellung der Arbeit

Das zelluläre Protein Notch ist für die Regulation von Proliferation, Apoptose und Differenzierung von großer Bedeutung (Übersicht: Kopan & Ilagan, 2009). Fehlfunktionen des Notch-Signalwegs haben gravierende Auswirkungen. 50% der T-ALL (T-Zell akuten lymphoblastische Leukämie) weisen Mutationen des Notch-Rezeptors auf (Weng et al., 2004). Aber auch solide Tumore sind mit Notch-Mutationen assoziiert (Übersicht: Wang, Z. et al., 2010). Die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus kann zunächst zur akuten infektiösen Mononukleose führen (Hislop et al., 2007). Anschließend persistiert das Virus in Form einer latenten Infektion in humanen B-Zellen (Übersicht: Thorley-Lawson, 2005). PTLD oder PCNSL sind zu 100% mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert. In diesen Erkrankungen werden alle latenten EBV-Proteine und somit auch EBNA2 exprimiert (Übersicht: Kutok & Wang, 2006).

Sowohl das zelluläre Notch-Protein, als auch das virale Protein EBNA2 sind bei der Regulation einer Vielzahl ihrer Zielgene von dem DNA-Bindeadapter CBF1 abhängig. Beide Proteine interagieren durch ihr WxP-Motiv mit der hydrophoben Bindetasche von CBF1. Allerdings unterscheiden sich Notch und EBNA2 in ihren Bindeaffinitäten zu CBF1 (Johnson et al., 2010). Außerdem führen Mutationen unterschiedlicher Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der hydrophoben Tasche von CBF1 zur Inhibition der Interaktion mit nur einem der zwei Proteine (Fuchs et al., 2001).

Da das zelluläre Notch-Protein und auch das virale EBNA2-Protein an der Entstehung von Tumorerkrankungen beteiligt sind und das CBF1-Protein sowohl für den kanonischen Notch-Signalweg als auch bei der Transaktivierung von EBNA2-Zielgenen eine Schlüsselrolle spielt, wäre eine Substanz, welche die CBF1-abhängige Transaktivierung von Notch- und/oder EBNA2-Zielgenen hemmen kann, ein wichtiges Werkzeug, das in der Therapie und auch in der Forschung angewendet werden könnte. Bisher gibt es keinen Wirkstoff, der die Notch- oder EBNA2-vermittelte Transaktivierung spezifisch inhibiert. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Strategien zur Identifizierung eines Hemmstoffes entwickelt.

Etablierung eines biochemischen Testsystems zur Identifizierung eines Inhibitors der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion

Die Etablierung eines biochemischen Testsystems, das auf der ELISA-Methode beruht, sollte es ermöglichen, Substanzen zu identifizieren, welche die Interaktion von CBF1 und Notch oder

CBF1 und EBNA2 inhibieren. Da die Struktur von CBF1 bekannt ist und auch die Bindung von Notch- oder EBNA2-Peptiden charakterisiert wurde, sollte dieses Testsystem so konzipiert werden, dass nur Moleküle, welche die Interaktion über die hydrophobe Bindetasche von CBF1 verhindern, als potentielle Hemmstoffe identifiziert werden.

Etablierung eines zellbasierten Testsystems zur Identifizierung eines Inhibitors der CBF1-vermittelten Transaktivierung durch EBNA2

Parallel zu dem ELISA-basierten Testsystem sollte ein zellbasiertes Testsystem entwickelt werden, mit dem Inhibitoren der CBF1-vermittelten Transaktivierung durch EBNA2 identifiziert werden können. Dieses Testsystem soll ermöglichen, Substanzen, welche die Zellmembran nicht passieren können oder toxisch sind, parallel auszuschließen. Da in einem zellbasierten Testsystem alle Komponenten, welche für die CBF1-vermittelte Transaktivierung durch EBNA2 benötigt werden, auch vorhanden sind, muss der Wirkungsort eines Inhibitors in Folgeexperimenten identifiziert werden.

Durchführung von „small molecule screens“ mit dem ELISA-basierten und dem zellbasierten Testsystem

Mit den in dieser Arbeit entwickelten Testsystemen sollten Bibliotheken von Substanzen, sogenannte „small molecule“-Banken, auf ihre Fähigkeit, die CBF1-vermittelte Transaktivierung durch EBNA2 bzw. die Interaktionen von Notch oder EBNA2 mit CBF1 zu inhibieren, überprüft werden. Falls durch diese „small molecule screens“ Hemmstoffe identifiziert werden können, sollten diese auf ihre Spezifität hin untersucht werden.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung
E. coli DH5 α :	F-, lacI-, recA1, endA1, hsdR17, Δ (lacZYA-argF), U169, F80dlac Δ M15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1; Invitrogen, UK;
E. coli BL21:	F-, dcm, opmT, hsdS (r_B - m_B -), gal λ , (DE3); Stratagene, UK
E. coli Rosetta:	F-, ompT, hsdS _B , (r_B - m_B -), gal, dcm, lacY1, (DE3), pRARE, (Cam ^R); Novagen,USA

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

2.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
DG75	humane EBV-negative Burkitt Lymphom-Zelllinie (Ben-Bassat et al., 1977)
HEK293	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert durch DNA-Fragmente des Adenovirus Typ 5 (Graham, Smiley, Russell & Nairn, 1977)
SM224.9	Humane EBV-negative Burkitt Lymphom-Zelllinie DG75 mit vollständiger Deletion von CBF1 (Maier et al., 2005)
SM295 D6	DG75, stabil transfiziert mit ER/EBNA2
MR31.6	SM296 D3 stabil transfiziert mit Doxzyklin induzierbarem GFP und NGFR
JV06 K4 E5	SM295 D6 stabli transfiziert mit EBNA2 induzierbarem GFP Reporterkonstrukt
MCF-7	humane Adenokarzinom-Zelllinie (Soule, Vazquez, Long, Albert & Brennan, 1973)

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

2.3 Oligonukleotide/ Primer

Alle hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von Metabion GmbH, Deutschland synthetisiert.

Name	Primer	Sequenz (5'-3')
EBV-C-Promotor	AGN589.1 fo	GTAAACACGCCGTGGGAAAAAATTT
	AGN589.2 rev	AAATTTTTTCCCACGGCGTGTTTAC

Tabelle 5: Oligonukleotide für Gel-Retardationsstudien

Protein	Fragment (AS)	Primer (Enzymschnittstelle)	Sequenz (5'-3')	Annealing-temp. [°C]	Produktgröße [bp]
EBNA2	CR6 (310-342)	AGN717.1 fo (EcoRI)	CGGAATTCATGAACGACCAACA ATTACATCATC	60	122
		AGN710.2 rev (NotI)	TTAGCGGCCGCTTTATCCCCGG CTCTGGCCT		
EBNA2	CR5+6 (277-342)	AGN710.1 fo (EcoRI)	CGGAATTCATGTCCCCGACTGT ATTTTATAAC	60	218
		AGN710.2 rev (NotI)	TTAGCGGCCGCTTTATCCCCGG CTCTGGCCT		
Notch	RAM (1761-1890)	AGN720.1 fo (EcoRI)	CGGAATTCATGCGGCGGCAGCA TGGCC	60	416
		AGN720.2 rev (NotI)	TTAGCGGCCGCTTTAGCAGGAG GCGATCATGAG		
Notch	RAMANK (1761-2127)	AGN720.1 fo (EcoRI)	CGGAATTCATGCGGCGGCAGCA TGGCC	60	1064
		AGN723.2 rev (NotI)	TTAGCGGCCGCTTTAATGCATG CGCTCCTGTGC		
CBF1	BTD (158-323)	AGN598.1 fo (NcoI)	GGCGCCATGGAGAAGCAGTCAT TGAAAAATGCTG	60	522
		AGN598.2 rev (KpnI)	AGTGGTACCTTATGCCTTATCT GTGCTAATGAT		

Tabelle 6: Primer zur Herstellung der Expressionskonstrukte von Proteinfragmenten

Die Primer wurden mit passenden Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende ausgestattet, die die Ligation in den entsprechenden Zielvektor ermöglichten. Die unterstrichenen Basen repräsentieren die Enzymschnittstellen.

2.4 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pGEX-6-P1	Vektor zur Expression von Fusionsproteinen mit C-terminalem GST-Tag; PreScission™ Protease Schnittstelle	GE Healthcare
pET Z fl-1b	Vektor zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen His- und Z-Tag; Ursprungsvektor pET24d(+); Tev Protease Schnittstelle	G. Stier, EMBL, unpubliziert
LS675/7	Episomal replizierender Vektor, CBF1-abhängige GFP-Expression unter der Kontrolle eines β-Globinpromotors; (12 CBF1 Bindestellen)	AG Strobl, Helmholtz Zentrum München

Tabelle 7: In der Arbeitsgruppe Kempkes bereits vorhandene Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Größe des Fusionsproteins
AGN632.1	Vektor zur Expression von CBF1-BTD (AS158-323) mit N-terminalem His- und Z-Tag; Tev Protease Schnittstelle	259AS / 29,3 kDa
AGN714	Vektor zur Expression von EBNA2-CR6 (AS310-342) mit C-terminalem GST-Tag; PreScission™ Protease Schnittstelle	267AS / 31 kDa
AGN719	Vektor zur Expression von EBNA2-CR5+6 (AS277-342) mit C-terminalem GST-Tag; PreScission™ Protease Schnittstelle	299AS / 34,2 kDa
AGN722	Vektor zur Expression von Notch-RAM (AS1761-1890) mit C-terminalem GST-Tag; PreScission™ Protease Schnittstelle	365AS / 42 kDa
AGN725	Vektor zur Expression von Notch-RAMANK (AS1761-2127) mit C-terminalem GST-Tag; PreScission™ Protease Schnittstelle	581AS / 65,4 kDa

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte Expressionskonstrukte

2.5 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Anwendung	Bezugsquelle
α-GST 6G9	Ratte, IgG2a	WB, ELISA	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
α-EBNA2 (WWP-K 6C8)	Ratte, IgG1	WB	
α-Notch (ICN5B5)	Ratte, IgG1	WB	
α-CBF1 (RBP-J 7A11)	Ratte, IgG2b	WB	
α-CBF1 (RBJ-1F1)	Ratte, IgG2b	EMSA	
α-N-terminal Histidin (N-His-2F12)	Maus, IgG1	WB, ELISA	

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Anwendung	Bezugsquelle
α-Ratte-IgG-HRP	Ziege	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA
α-Maus-IgG-HRP	Schaf	WB	Amersham Biosciences

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

ELISA= „enzyme linked immunosorbent assay“; EMSA= „electro mobility shift assays“;
WB = Western-Blot

2.6 Peptide

Peptid	Sequenz	Bezugsquelle
vIRF4 wt	Bio-AA-IRAPVWHPPVGHA	HZI Braunschweig, AG Ronald Frank
vIRF4 mt	Bio-AA-IRAPVAHAPVGHA	
Notch wt	Bio-AA-RRQHGQLWFPEGF	
Notch mt	Bio-AA-RRQHGQLLAAEGF	
EBNA2 wt	Bio-AA-HHLPSGPPWPPV	
EBNA2 mt	Bio-AA-HHLPSGPPSRPPV	

Tabelle 11: Sequenzen der Biotin gekoppelten Peptide

2.7 Material für Bakterienstämme

Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Bacto-Agar	Becton, Dickinson
Chloramphenicol	
Gentamicin	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
Select-Agar	Invitrogen, UK

2.8 Material für Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
DMEM	GIBCO, UK
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, USA
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Österreich
Hygromycin B	Invitrogen, UK
L-Glutamin	GIBCO, UK
OptiMEM Medium	GIBCO, UK
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, UK
Puromycin	Merck (Calbiochem), Deutschland
RPMI 1640-Medium	GIBCO, UK
Trypsin	GIBCO, UK

2.9 DNA- und Protein-Standards

1 kb DNA ladder	Invitrogen, UK
100 bp DNA ladder plus	MBI Fermentas, Deutschland
2 log Marker	New England Biolabs, USA
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, Deutschland
λ DNA/ <i>Hind</i> III Fragments	GIBCO, UK

2.10 Enzyme und Reagenziensysteme

Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Deutschland
ECL™ Reaktionssystem	GE Healthcare (Amersham), UK
JETSTAR 2.0	Genomed, Deutschland
Klenow Enzym	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Deutschland
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Deutschland
PrimeSTAR™ HS	MoBiTec, Deutschland
Proteinase K (PCR grade)	Roche Diagnostics, Deutschland
Pwo-DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Deutschland
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs, USA; MBI Fermentas, Deutschland
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, USA
T4-Polynukleotid Kinase (PNK)	MBI Fermentas, Deutschland

2.11 Chemikalien und Reagenzien

1-Step Ultra TMB - ELISA Substrate	Thermo Fisher Scientific, USA
Acetyl-Coenzym A	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Acrylamid 30%	Roth, Deutschland
Agarose	Invitrogen, UK
APS	MP Biomedicals, Deutschland
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	MP Biomedicals, Deutschland
Chloroform	Merck, Deutschland
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Deutschland
Formaldehyd, 37%	Merck, Deutschland
Formamid, deionisiert	Roth, Deutschland
Galacton-Plus	Applied Biosystems, Deutschland
Isoamylalkohol	Roth, Deutschland
Luciferin	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Milchpulver	AppliChem, Deutschland
MS2 RNA	Roche Diagnostics, Deutschland
Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt (Poly-dI-dC)	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, USA
Protein G-Sepharose	GE Healthcare, UK
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Streptavidin-Agarose	Invitrogen, UK
TEMED	GE Healthcare, UK
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitanmonol-aureat)	AppliChem, Darmstadt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von MP Biomedicals, Deutschland, Merck und Sigma bezogen.

2.12 Verbrauchsmaterial

ART Aerosol Resistant Tips	Molecular BioProducts, USA
Elektroporationsküvette, Gene Pulser 0,4 cm	Bio-Rad Laboratories, USA
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, USA
Gel-Blotting-Papier 3MM	Schleicher & Schüll, Deutschland
Hyperfilm ECL TM	Amersham Bioscience, Schweden
Immobilion PVDF Membran	Millipore, USA
Membranfilter	Schleicher & Schuell, Deutschland
Minisart Einwegspritzenfilter, steril 0,2/ 0,4/ 0,8/ 1,2 µm	Sartorius, Deutschland

Plastikwaren wurden von Becton-Dickinson GmbH, Eppendorf, Greiner GmbH und NUNC GmbH, Deutschland, bezogen.

2.13 Laborausstattung

3.2RS Varifuge	Heraeus Instruments, Deutschland
6K10 Zentrifuge	SIGMA Centrifuges GmbH, Deutschland
Bakterien-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, USA
BioScan Model QC-4000 XER radioisotope counter	American Instrument Exchange, Inc., USA
CP1000 Entwicklermaschine	AGFA, Köln
ELISA-Reader Sunrise	Tecan, Crailsheim
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad, Deutschland
FACS Calibur	BD Biosciences, USA
Geldokumentationssystem	Ltf Labortechnik, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (DNA)	PeqLab, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (Protein)	Amersham Bioscience, Schweden
GeneAmp PCR System 9600	PerkinElmer, USA
BD TM LSR II flow cytometer	BD Biosciences, USA
Neubauer Zählkammer	Menzel-Gläser, Deutschland
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, USA
Phosphoimager FLA 5100, Verstärkerfolie, Filmkassetten	FujiFilm, Kleve
Quarzküvette	Biometra GmbH, Deutschland
RC5C Zentrifuge	DuPont, USA
Rotanta 460 R Zentrifuge	Hettich, Deutschland
Schüttel-Inkubator	New Brunswick Scientific, USA
Sonifier II W-250 D	Branson Ultrasonics Corporation, USA
Spannungsquellen	Biorad, USA

Spektralphotometer Gene Ray (Protein)	Biometra GmbH, Deutschland
Spektralphotometer Ultrospec 1100 pro (DNA, RNA)	GE Healthcare (Amersham), UK
Sterilbank	Heraeus Instruments, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
UV-Transiluminator	PeqLab, Deutschland
Zell-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Zentrifuge 5415	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Deutschland

2.14 Datenbanken, Internet-Programme und Computer-Software

AIDA Alias Software	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
BD FACSDiva™	BD Biosciences, USA
CellQuestPro	BD Biosciences, USA
Clone Manager 8, Version 8.03	Scientific & Educational Software, USA
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
EndNote X2	Thomson Reuters, New York (USA)
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
FlowJo	Tree Star Inc., USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, USA
HotPOINT	http://prism.cccb.ku.edu.tr/hotpoint/index.php
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu
Q-SiteFinder	www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder
Simplicity 4.02 (Luminometer)	Berthold Detection Systems, USA

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

E. coli Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten oder in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37°C expandiert. Zur Kultivierung einzelner Kolonien wurden die Bakterien auf LB-Platten ausplattiert. Einzelne Klone wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h in LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht geschüttelt. Die Selektion von transformierten Bakterien erfolgte auf Agar-Platten oder in Flüssigkulturen mit entsprechenden Antibiotika. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 900 µl Bakterienkultur mit 100 µl DMSO versehen und bei -80°C eingefroren.

LB-Medium:	1% Bacto-Trypton; 0,5% Yeast-Extract; 1% NaCl (pH 7,4)
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar
Antibiotika:	50 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin; 50 µg/ml Chloramphenicol

3.1.2 Herstellung CaCl₂-kompetenter Bakterien

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C inkubiert, nach 24 h in 500 ml Medium überführt und bis zu einer OD₅₉₀ von 0,375 expandiert. Nach einer Inkubation von 5 -10 min auf Eis wurden die Zellen bei 16000 g bei 4°C für 7 min abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Kulturen wurden erneut bei 1100 g und 4°C abzentrifugiert, in eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und wieder für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen, zu je 300 µl in eisgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und sofort in einem Eis-Ethanol-Gemisch schockgefroren. Die CaCl₂-kompetenten Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

CaCl₂- Lösung:	60 mM CaCl ₂ ; 10 mM PIPES (pH 7,0); 15% Glycerol
----------------------------------	--

3.1.3 Bestimmung der Transformationseffizienz chemisch kompetenter Bakterien

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 100 µl CaCl₂-kompetente Bakterien mit 100 ng pUC19-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für 50 sek wurden die Bakterien in 900 µl LB-Medium aufgenommen. Je 100 µl Zellen von 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ und 10⁻⁶ Verdünnungen wurden auf LB-Platten mit Ampicilin zur Selektion ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien für jede Verdünnung ausgezählt. Eine optimale Transformationseffizienz der Bakterien liegt zwischen 10⁵-10⁷ cfu (*colony forming units*)/ µg DNA. Wie diese berechnet wird sieht man in folgender Formel:

$$\frac{cfu}{\mu g DNA} = \frac{Anzahl\ der\ Kolonien}{DNA\ in\ \mu g \times Verdünnungsfaktor}$$

3.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 50-100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz oder 0,1-1 µg Plasmid DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 50 sec, wurden die Bakterien in 300 µl LB-Medium resuspendiert, 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung der Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. In das Kulturmedium RPMI 1640 wurden zusätzlich 10% fetales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicilin/Streptomycin gegeben. Im Folgenden wird dieses als Vollmedium bezeichnet.

3.2.1.1 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die Zelllinien DG75 und DG75 CBF1 ko (SM224.9) wurden in Vollmedium kultiviert und alle 4 Tage im Verhältnis 1:2 verdünnt, so dass eine Zelldichte von $2-5 \times 10^5$ Zellen/ml gewährleistet wurde.

Die Zelllinie MR31.6 wurde in Medium mit $1 \mu\text{g/ml}$ Puromycin kultiviert. Zur Induktion der GFP-Expression wurden in dieser Zelllinie Doxzyklinkonzentrationen von bis zu 40 ng/ml verwendet. Das Medium der Zelllinie SM295 D6 wurde zusätzlich mit $1,2 \text{ mg/ml}$ des Antibiotikums G418 versetzt. Die Zelllinie JV06 K4 E5, die aus der Zelllinie SM295 D6 hervorgeht, wurde in Vollmedium mit $1,2 \text{ mg/ml}$ G418 und $200 \mu\text{g}$ Hygromycin kultiviert. Zur Induktion der GFP-Expression wurde Östrogen in einer Konzentration von bis zu 100 nM verwendet.

3.2.1.2 Kultivierung von adhärenenten Zelllinien

Die adhärenente HEK293 Zelllinie wurden in Vollmedium in Kulturschalen gehalten. Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin-EDTA gewaschen, dann mit Trypsin-EDTA inkubiert, um sie von der Kulturschale zu lösen und in frischem Vollmedium verdünnt.

3.2.1.3 Aufbewahrung von Zellen

1×10^7 Zellen bzw. eine Kulturschale (10 cm^2) zu ca. 50% konfluenter Zellen wurden bei 300 g für 10 min abzentrifugiert und in $1,5 \text{ ml}$ Einfriermedium resuspendiert. Anschließend in einem bei 4°C vorgekühlten Adapter oder in mehreren Lagen Küchenpapier mindestens 2 Tage bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden so schnell wie möglich aufgetaut und direkt in 30 ml vorgewärmtes RPMI-Vollmedium gegeben. Nach Pelletierung bei 300 g für 10 min wurden die Zellen in 10 ml mit 37°C warmem RPMI-Vollmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche bzw. Kulturschale gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$. Erst am darauf folgenden Tag wurden die Selektionsmittel wie G418, Hygromycin oder Puromycin in das Medium gegeben.

Einfriermedium: 40% RPMI 1640; 50% FCS; 10% DMSO

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden die Zellen 1:2 mit einer 0,4% -igen Trypanblau-Lösung verdünnt, 10 μ l in die Zählkammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte optisch anhand des Farbunterschieds. Da der Farbstoff durch die Membran toter Zellen ins Zytoplasma eindringen kann, erscheinen sie blau, lebende Zellen dagegen weiß. Die Berechnung der Zelldichte erfolgte anhand folgender Formel:

$$n_z = \mu_z \times v_z \times 10^4$$

n_z = Anzahl der Zellen/ml

μ_z = Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat

v_z = Verdünnungsfaktor

3.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

3.2.2.1 Stabile Transfektion von Suspensionszellen durch Elektroporation

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Suspensionszellen im Verhältnis 1:2 verdünnt. Pro Transfektionsansatz wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, zweimal mit Medium gewaschen und in 250 μ l Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der entsprechenden Plasmid-DNA gemischt und in eine „GenePulser“-Küvette (Biorad) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 220 V und 950 μ F. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in kleine Zellkulturflaschen überführt. Am folgenden Tag wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml auf 96-Loch-Platten ausgesät und aufgrund der geringen Zelldichte mit α -Thioglycerol sowie einem Antibiotikum zur Selektion versetzt. Sobald Zellen in einigen Löchern zu wachsen begonnen haben, wurden sie in Platten mit größerem Volumen umgesetzt und die Expression des transfizierten Proteins mittels FACS (Kapitel 3.2.4.1) überprüft.

3.2.2.2 Transiente Transfektion von adhärennten Zellen mit Polyethylenimin (PEI)

HEK293 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml auf einer Zellkulturschale (10cm²) oder auf einer 6-Loch-Platte ausgesät, so dass am Tag der Transfektion eine Zelldichte von ca. 70% vorlag. Vor der Transfektion wurden die Zellen 30-60

min in 1 ml Minimalmedium (OptiMEM) pro Loch oder 3 ml pro Kulturschale inkubiert. Die entsprechende Plasmid-DNA wurde in einem Eppendorfgefäß in 100 µl (6-Loch-Platte) oder 300 µl (10cm² Kulturschale) OptiMEM vorgelegt; parallel dazu wurden 4 µl PEI (1 µg/µl) in 100 µl OptiMEM pro Loch oder 12 µl PEI in 300 µl OptiMEM pro Kulturschale angesetzt. Anschließend wurden die Ansätze vereinigt, bei RT für 20-30 min inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach vier Stunden wurde das Minimalmedium mit dem Transfektionsmix vorsichtig abgenommen und durch Vollmedium ersetzt. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet.

3.2.2.3 Transiente Transfektion von Suspensionszelllinien durch Elektroporation

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Suspensionszellen im Verhältnis 1:2 verdünnt. Pro Transfektionsansatz wurden 0,5-1x10⁶ Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, zweimal mit Medium gewaschen und in 250 µl Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der entsprechenden Plasmid-DNA gemischt und in eine „GenePulser“-Küvette (Biorad) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 220 V und 950 µF. Anschließend wurden die Zellen in kleine Kulturschalen mit 5 ml Vollmedium überführt, für 48 h inkubiert und geerntet.

3.2.3 Promotor-Reporterstudien

Alle Promotorstudien basierten auf Reportergenkonstrukten, die für das Luziferasegen kodierten. Um mögliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Ansätzen auszugleichen, wurde zu jedem Transfektionsansatz ein lacZ (β-Galaktosidase) - Expressionsplasmid, das unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors steht, kotransfiziert. Die Konzentration der eingesetzten Plasmid-DNA-Konstrukte war für jedes Experiment spezifisch. Jede Transfektion wurde in Triplikaten, wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben, durchgeführt.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 100 µl Luc-Extraktionspuffer lysiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (16000 g, 4°C, 15 min) wurde der Proteinüberstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden je 10 µl der Proteinlysate im Duplikat auf eine Mikrotiterplatte vorgelegt und im Luminometer (Orion Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems Berthold) nach automatischer Zugabe von 50 µl Luc-Messpuffer gemessen.

Zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden parallel 10 μ l der Lysate im Duplikat auf eine weitere Mikrotiterplatte überführt und mit 100 μ l β -Gal-Reaktionspuffer für 20min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Biolumineszenz unter automatischer Zugabe von 50 μ l β -Gal-Messpuffer im Luminometer. Zur Normalisierung der Luziferase-Werte wurde der Quotient aus der relativen Luziferase-Aktivität und der realtiven β -Galaktosidase-Aktivität berechnet.

5xLuc-Extraktionspuffer:	50% (w/v) Glycerin; 5% (w/v) Triton X-100; 10 mM EDTA (pH 8,0); 125 mM Tris/HCl (pH 7,8); im 1xPuffer 2 mM DTT
Luc-Messpuffer:	20 mM Tricin; 1,07 mM (MgCO ₃) \cdot Mg(OH) ₂ \cdot 5(H ₂ O); 2,67 mM MgSO ₄ ; 0,1 mM EDTA (pH 8,0); 33,3 mM DTT; 270 μ M Acetyl-Coenzym A; 470 μ M Luziferin; 530 μ M ATP; Lagerung im Dunkeln bei -20°C
β-Gal-Reaktionspuffer:	100 mM NaP (pH 8,0); 1mM MgCl ₂ ; 1% Galacton-Plus
β-Gal-Messpuffer:	0,2 M NaOH; 10% Emerald-Enhancer

3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wird auch als „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) bezeichnet und ermöglicht die Charakterisierung von Zellen in heterogenen Zellpopulationen. Dabei können Parameter wie Zellgröße, Granularität, Expression von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen, sowie Zellzyklusphasen mit Hilfe von unterschiedlichen Färbemethoden oder modifizierten Proteinen erfasst werden. Bei der Messung wird die Zellsuspension im Durchflusszytometer in eine Kapillare gesaugt, so dass die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren. Abhängig von der Zellgröße und der Granularität der Zelle, wird das Licht unterschiedlich gestreut und kann von mehreren Detektoren gemessen werden. Vor dem Strahl befindet sich der FSC (Forward Scatter), der die Beugung des Lichtes erfasst, die mit der Zellgröße korreliert. Die Brechung des Lichtes ist von der Granularität der Zelle abhängig und wird von dem auf den Seiten befindlichen SSC (Sideward Scatter) gemessen. Diese zwei Parameter ermöglichen bereits eine Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen, die durch das Setzen von Grenzen („gates“) gezielt betrachtet werden können.

Des Weiteren können mit der Durchflusszytometrie auch Fluoreszenzfarben gemessen werden. Sie dienen zum einen für die Unterscheidung der lebenden von den toten Zellen (Propidiumjodid-Färbung ohne Fixierung der Zellen), die Bestimmung der Zellzyklusphase (Propidiumjodid-Färbung nach Permeabilisierung der Membran) und für den Nachweis von intrazellulär exprimierten Reporterproteinen, wie GFP („green fluorescent protein“) oder von

Oberflächenmarkern der Zelle. Für den Nachweis der Oberflächenmarker wurden spezifische Antikörper verwendet, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Durch das Laserlicht werden die Fluorochrome angeregt und das emittierte Licht wird im Fluoreszenzkanal aufgezeichnet. Diese Messung ermöglicht eine Aussage über die Expression der durch Antikörperbindung markierten Moleküle und Reporterproteine.

Die durchflusszytometrischen Experimente wurden an einem BD FACSCalibur™ oder einem BD LSR-II™ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software.

3.2.4.1 Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen

Der Anteil der lebenden Zellen wurde zum einen durch die Färbung mit Propidiumjodid und zum anderen durch das setzen von „gates“ im FSC/SSC bestimmt. Für die Färbung mit Propidiumjodid wurden die Zellen 10 min vor der Messung mit einer Propidiumjodidlösung in einer Endkonzentration von 50 µg/ml gemischt. Die Propidiumjodidfärbung wurde am BD LSR-II™ mit dem UV Laser mit 355 nm angeregt und mit dem Filter 630/22 nm gemessen. Am BD FACSCalibur™ wurde die Färbung mit dem blauen Laser mit 488 nm angeregt und in dem Kanal FL2 gemessen. Zusätzlich wurden die lebenden Zellen durch ihrer Morphologie von den toten oder apoptotischen Zellen und Zellbruchstücken unterschieden. Die verwendeten Zelllinien stammen von B-Lymphozyten ab, die eine distinkte Zellpopulation bilden, wenn man den FSC gegen den SSC aufträgt im Dot-Plot (Punktediagramm) aufträgt. Die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen zeigten nur sehr geringe Variationen.

3.2.4.2 Nachweis der Expression von GFP

Für den Nachweis der GFP-Expression war eine Färbung nicht mehr nötig, da das GFP Protein nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm Licht der Wellenlänge von 510 nm emittiert. Die Emission wurde am BD LSR-II™ durch den Filter 530/30 nm und am BD FACSCalibur™ in Kanal FL1 gemessen. Die Messung der GFP-Expression von jeweils $1,5 \times 10^4$ lebenden Zellen (siehe Absatz 3.2.4.1) wurde entweder direkt in einer 96-Loch-Platte mit dem HTS Aufsatz am BD LSR-II™ oder für jede Probe einzeln, nachdem die Zellen in FACS-Röhrchen überführt worden waren, am BD FACSCalibur™ durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Arbeiten mit DNA

3.3.1.1 Schnelle Plasmidisolierung

Von einer 5 ml Übernachtskultur wurden 3 ml bei 11000 g für 3 min abzentrifugiert, das Bakterien-Pellet in 300 µl TENS-Puffer lysiert, nach 5 min Inkubation bei RT mit 150 µl 3 M NaAc (pH 5,2) gemischt und für weitere 5 min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 16000 g für 10 min wurden 400 µl des klaren Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 900 µl 100% Ethanol gefällt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, wieder abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 30 µl TER-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Alternativ wurde die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA wurden 2 µl DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt.

TENS: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8); 0,1 M NaOH; 0,5% SDS

TER: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8); 100 µg/ml RNase A

3.3.1.2 Präparative Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus einer 400 ml Bakterienkultur wurde mit den Plasmid-Maxipräparationskit Jetstar Genomed 2.0 nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Je nach DNA-Menge wurde das Pellet nach der Fällung in 100-300 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8)

3.3.1.3 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption einer Verdünnung in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Qualität der DNA wurde auf Verunreinigungen durch Proteine (280 nm) und organische Verbindungen

(230 nm) überprüft, wobei das Verhältnis $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ etwa 1,8 betragen sollte. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

c = Konzentration der DNA – Probe

A_{260} = Absorptionswert bei 260 nm

3.3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragmentes *in vitro* wurden Oligonukleotid-Primerpaare verwendet, die sequenzspezifisch an komplementäre denaturierte Template-DNA hybridisieren und den zu amplifizierenden Bereich gegenläufig orientiert flankieren. Als Template wurden sowohl genomische DNA als auch Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde die PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase der Firma Mobitec (TaKaRa) eingesetzt. Für einen 50 μl Reaktionsansatz wurde 50-100 ng genomische DNA oder Plasmid-DNA als Template, je 300 nM *forward* und *reverse* Primer, 200 μM dNTP-Mix, 1xPrimeSTAR-Puffer und 1,25 U/ 50 μl PrimeSTAR-DNA-Polymerase eingesetzt. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zyklen	Programm	Temperatur [°C]	Zeit
1	Denaturierung	96	5 min
25	Denaturierung	98	30 sec
	Primerhybridisierung	55-60	5 (TM \geq 55°C)-15- sec (TM < 55°C)
	Elongation	72	1 min/ kb
1	Elongation	72	7 min

Tabelle 12: PCR-Programm für die PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

3.3.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die direkte Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem Nucleo Spin® Extract II Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden überschüssige Primer und Nukleotide aus dem Ansatz entfernt. Das PCR-Produkt wurde in 30 μl H₂O gelöst.

Nach einem Restriktionsverdau wurde der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen, die spezifischen DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und nach Herstellerprotokoll des Nucleo Spin® Extract II Kit präpariert. Die Fragmente wurden in 50 μl H₂O aufgenommen. aufgenommen.

3.3.1.6 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente einer Größe von 2-10 kb wurden über ein 0,8%-iges und einer Größe unter 2 kb über ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1xTAE-Laufpuffer gelöst und mit 10mg/ml Etidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1xDNA-Ladepuffer gemischt und mit einem geeigneten Größen- oder Mengenstandard elektrophoretisch bei 5-8 V/ cm aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden im UV-Licht bei 254 nm auf einen UV-Transluminator kontrolliert.

TAE-Laufpuffer : 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA (pH 8,0)

DNA-Ladepuffer: 10% Bromphenolblau; 30% Glycerin

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurde in den Reaktionspuffern des Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsenzyme (1 U/ 1 µg DNA pro h) wurden so eingesetzt, dass sie maximal einem Zehntel des Reaktionsvolumens entsprachen. Die eingesetzte DNA sollte eine Konzentration von 200 ng/µl nicht überschreiten. Die Reaktion wurde anschließend bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur gestoppt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

3.3.1.7 Ligation von DNA

Um ein DNA-Fragment (Insert) mit passenden Schnittstellen in ein Plasmid-DNA-Rückgrat zu klonieren wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. 1 U ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 50% verdauter DNA-Fragmente in einem Endvolumen von 20 µl in 30 min bei 16°C zu ligieren. Für die Ligation wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. 50 ng Vektor, die entsprechende Menge an Insert und 1xT4 DNA-Ligase Puffer mit H₂O auf einen 20 µl Ansatz gebracht. Von diesem Ansatz wurden je 10 µl auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. Ein Ansatz wurde mit 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl) versetzt, während der andere als Negativkontrolle für nicht linearisierte Zielvektoren verwendet wurde. Nach einer Inkubation von 2-3h bei RT oder über Nacht bei 16°C wurden DH5α-Bakterien mit den Ligationsansätzen transformiert.

3.3.1.8 Klonierung von Plasmidvektoren

Für die Klonierung von Säugerzellexpressionsvektoren oder Promotor-Reportergenkonstrukten, wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus genomischer DNA mittels PCR mit sequenzspezifischen Primerpaaren, die am 5'-Ende mit zwei unterschiedlichen überhängenden

Restriktionsschnittstellen ausgestattet waren, hergestellt. Die PCR-Fragmente, die mit dem Nucleo Spin[®] Extract II Kit aufgereinigt wurden, und die Zielvektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, über das Nucleo Spin[®] Extract II Kit aufgereinigt und in 30 µl H₂O eluiert. 10% des Eluats wurde parallel mit einem Mengenstandard, *Hind*III verdauter λ-DNA, auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend die DNA-Konzentration mittels der Bandenintensität im Vergleich zum Standard abgeschätzt. Die Ligation erfolgte im molaren Verhältnis 1:3 von Vektor zu Insert. *E. coli* DH5α-Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und auf Selektionsplatten kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Klonen präpariert und mit Hilfe von Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.3.1.9 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der Expressionsvektoren oder Promotor-Reporter-genkonstrukte wurde bei der Firma MWG, Ebersberg, durchgeführt und mit Hilfe der Software ClustalW ausgewertet.

3.3.1.10 real-time PCR

Die Analyse und relative Quantifizierung von viralen Transkripten in latenten und reaktivierten KSHV-infizierten Zellen erfolgte mit Hilfe der *real-time* PCR im LightCycler 480 II Gerät der Firma Roche Diagnostic. Die Methode basiert auf dem SYBR-Green I System, einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Die Messung der emittierten Fluoreszenz des eingelagerten Farbstoffes am Ende jedes Zyklus nach der Elongationsphase, ermöglichte die Detektion der akkumulierenden PCR-Produkte. Der *cycle-threshold* (Ct)-Wert wird als Kreuzungspunkt bezeichnet und wurde für die Berechnung der relativen Transkriptmenge verwendet. Er beschreibt die Anzahl der Zyklen, an welchen das Fluoreszenzsignal des Amplifikats erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Umso höher die Anreicherungen eines Templates in der Ausgangsprobe sind, desto niedriger ist die Zyklenzahl des Ct-Wertes. Die Berechnung von Ct erfolgt durch die Software von Roche nach der „Second Derivative Maximum“-Methode, die das Maximum der zweiten Ableitung einer Kurve bestimmt, an dem sich die Probenfluoreszenz am deutlichsten von der Hintergrundfluoreszenz absetzt.

Die ideale Amplifikationseffizienz entspricht einer Verdoppelung der eingesetzten cDNA pro Zyklus. Abhängig von Fragmentlänge, Qualität des Templates oder der zu amplifizierenden DNA-Sequenz kann die Amplifikationseffizienz variieren. Um die Amplifikationseffizienz der

verschiedenen Primerpaarkombinationen in der Berechnung der relativen Transkriptmenge zu berücksichtigen, wurde für jedes Transkript eine Standardkurve erstellt. Die Standardkurve der entsprechenden Gene setzte sich aus einer Verdünnungsreihe (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} und 10^{-10}) eines PCR-Produktes in 10 µg/ µl MS2-RNA zusammen. Die Phagen-RNA diente zur Stabilisierung des PCR-Templates und ermöglichte das wiederholte Einfrieren und Auftauen der Proben. Die Ct-Werte der Amplifikate der Standardkurve wurden gegen den dekadischen Logarithmus der relativen Konzentration aufgetragen und die Amplifikationseffizienz aus der Steigung der Geraden nach folgender Formel berechnet:

$$N_n = N_0 \times E^{Ct}$$

N_n = Anzahl der Moleküle im PCR – Zyklus n

N_0 = Anzahl der Moleküle zu Beginn der Reaktion

E = Amplifikationseffizienz

Ct = Kreuzungspunkt

Die relative Quantifizierung wurde im Verhältnis zu der Standardprobe der 10^{-6} -Verdünnung, die im Folgenden als Kalibratorprobe bezeichnet wird, bestimmt.

Um mögliche Unterschiede zwischen den eingesetzten cDNA-Proben auszugleichen, wurde parallel für jede Probe die Transkriptmenge eines Referenzgens ermittelt. Es handelte sich dabei um typische Haushaltsgene, die unabhängig von Zelltyp und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert werden. Für die hier durchgeführten Studien wurde GAPDH als Referenzgen ausgewählt.

Bei der relativen Quantifizierung wurde die Menge des zu quantifizierenden Transkriptes mit dem Referenzgen verglichen. Die relative Transkriptmenge, d.h. die Menge des Zielgens nach interner Normalisierung auf die Menge des Referenzgens, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Transkriptmenge} = \frac{M_{ZSP}/M_{RSP}}{(M_{ZSC}/M_{RSC}) \times 10^6}$$

M_{ZSP} = Menge des Zielgens in der Probe

M_{RSP} = Menge des Referenzgens in der Probe

M_{ZSC} = Menge des Zielgens im Kalibrator

M_{RSC} = Menge des Referenzgens im Kalibrator

Die PCR-Reaktionsansätze setzten sich nach Angaben des Herstellers aus je 1 µl *forward* und *reverse* Primer in einer Endkonzentration von 0,5 µM, 2 µl cDNA-Template und 5 µl des SYBR

Green I Master-Mix zusammen. Je nach Abundanz des zu quantifizierenden Transkriptes wurde die cDNA unverdünnt oder in einer angemessenen Verdünnung eingesetzt. Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Loch der LightCycler 480 Multiwell-Platte. Neben einem Ansatz mit H₂O anstelle von cDNA, wurde die genspezifische Kalibratorprobe in allen *real-time* PCR-Analysen im Duplikat mitgeführt. Das Standardprogramm für die *real-time* PCR-Analysen ist in Tabelle 13 dargestellt.

„Analysis Mode“	Zyklen	Segment	Temp. ¹ [°C]	Zeit ²	„Acquisition Mode“
none	1	Pre-Incubation	95	10 min	none
Quantification	45	Denaturation	95	2 sec	none
		Annealing	63	10 sec	none
		Extension	72	20 sec	single
Melting curves	1	Denaturation	95	5 sec	none
		Annealing	65	1 min	none
		Melting	97 („ramp rate“ = 0,11°C/ sec)	0 sec	continuous
none	1	Cooling	40	30 sec	none

Tabelle 13: Das *real-time* PCR-Programm

¹ Temperaturanstieg/ -abfall („ramp rate“) von 20°C/ sec, falls nicht anders angegeben

Im Anschluss jeder PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die über die Qualität der PCR-Produkte und die Spezifität der Reaktion Auskunft gab.

3.3.2 Arbeiten mit RNA

3.3.2.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden $0,5 \cdot 10^7$ Zellen abzentrifugiert und die RNA mittels peqGOLD TriFast (PEQLAB) nach Angaben des Herstellers präpariert. Die RNA-Pellets wurden in 10-50 µl sterilem H₂O für 10 min bei 56°C unter Schütteln gelöst. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.3.2.2 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Qualität der RNA wurde auf Verunreinigungen durch Proteine (280 nm) und organische Verbindungen (230 nm) überprüft, wobei das Verhältnis $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ etwa 1,8-2 betragen sollte. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

c = Konzentration der DNA – Probe

A_{260} = Absorptionswert bei 260nm

3.3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die Qualität der RNA wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen kontrolliert. Für 1,2%-ige Agarosegele wurde Agarose mit autoklaviertem H₂O geschmolzen, auf 60°C abgekühlt, mit 2,2 M Formaldehyd (37%) versetzt und mit 1xMOPS auf das entsprechende Gelvolumen aufgefüllt. 5 µg RNA wurden auf Eis mit 2 µl 5xMOPS, 3,5 µl Formaldehyd (37%, 10 µl Formamid (100%) und 0,08 µl Ethidiumbromid (10 µg/ µl) versetzt, für 15 min bei 56°C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl RNA-Ladepuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 1-2 V/ cm in 1xMOPS-Laufpuffer aufgetrennt. Die RNA-Banden für die 18S und 28S rRNA wurden im UV-Licht bei 254 nm auf einem UV-Transluminator kontrolliert. Bei intakter RNA wurden deutlich abgegrenzte Banden detektiert.

10xMOPS: 0,4 M MOPS (pH 7,0); 0,1 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA (pH 8,0)

RNA-Ladepuffer: 50% Ficoll; 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,4% Bromphenolblau

3.3.2.4 DNase-Verdau von RNA

Um die Kontamination von genomischer DNA in den RNA-Proben zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau mit 10 µg RNA und 1 U RQ1 RNase-Free DNase (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch die Zugabe von 2 U RNasin pro Reaktionsansatz wurde die Degradation von RNA vorgebeugt.

3.3.2.5 Reverse Transkription in cDNA

Die DNase verdaute RNA wurde mittels den High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben. Für eine Reaktion wurde 1 µg RNA, 1x dNTP-Mix, 1xRT-Puffer, 1xRT-Random-Primer und 1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Ansätze wurden zusätzlich mit 10 U RNasin versetzt und mit Nuklease-freiem H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde ein paralleler Ansatz mit H₂O anstelle der reversen Transkriptase mitgeführt. Das Programm für die cDNA-Synthese ist in

Tabelle 14 dargestellt. Die cDNA wurde unverdünnt oder in einer angemessenen Verdünnung anschließend für *real-time* PCR-Analysen eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
1	30	15 min
1	42	15 min
1	52	15 min
1	70	10 min

Tabelle 14: Das Programm für die cDNA-Synthese

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Extraktion von Proteinen wurden $0,5-1 \times 10^7$ Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und in 100-300 µl RIPA-Puffer lysiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C wurden die Zellen im Branson Digital Sonifier W-250 D unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospritze sonifiziert (3x10 sec, Amplitude von 20%). Die Zelltrümmer wurden bei 15000 g für 15 min abzentrifugiert und das klare Proteinlysate in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

PBS: 137 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na_2HPO_4 ; 1,5 M KH_2PO_4 pH 7,4

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/ HCL pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Igepal; 0,5% DOC; 0,1% SDS;
1x Complete Proteinase-Inhibitor (Roche) frisch hinzufügen

3.4.2 Bakterielle Expression und denaturierende Präparation des CBF1-Proteins

Der His-CBF1-Expressionsvektor (Maier et al., 2005) wurde in BL21 (DE3) pLysS-*E.coli* Bakterien (Promega) transformiert, auf Kanamycin - Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert. Nach 24 h wurde mit einem Klon eine Flüssigkultur angeimpft, bis zu einer Dichte von $\text{OD}_{595} = 0,8$ bei 37°C kultiviert und mit 1 mM IPTG für 4 h bei 30°C induziert. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in Puffer B resuspendiert. Die Bakterienlysate wurden im Branson Digital Sonifier W-250 D unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospritze auf Eis sonifiziert (2x5 min, Amplitude von 20%).

Nach einem Zentrifugationsschritt von 20000 g für 20 min wurde das klare Bakterienlysat mit äquilibrierter Ni-NTA („*nickel-nitrilotriacetic acid*“) - Agarose über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine Chromatographie - Säule (BioRad) geladen. Die Säule wurde mit Puffer B und dann mit Puffer C gewaschen bis kein Protein im Durchfluss nachweisbar ist, bevor das Protein mit Puffer C plus 50 mM reduziertem Gluthation eluiert wurde. Für die Rückfaltung des Proteins wurde 1ml der eluierten Proteins tropfenweise mit „refold“ Puffer bis auf 8 ml verdünnt, so dass eine 1 M Harnstoff Konzentration vorlag.

Puffer B:	8 M Harnstoff, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris/ HCl, β - mercaptoethanol, <u>pH 8,0</u> , 1x Complete Proteinase-Inhibitor (Roche) frisch hinzufügen
Puffer C:	8 M Harnstoff, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris/ HCl, β - mercaptoethanol, <u>pH 6,3</u>
„refold“ Puffer:	100 mM Arginin, 25% Glycerol, 5 mM Glutathion (red.), 0,5 mM Glutathion (ox.), 0,5% Tween 20, pH 8,0

3.4.3 Bakterielle Expression und native Präparation rekombinanter Proteine

Während der Transformation, Expression und Aufreinigung wurden mehrere Proben der Bakterien genommen, um den gesamten Vorgang zu dokumentieren. Als Referenz für bakterielle Proteine diente eine Probe der nicht transformierten *E.coli* Rosetta (P1). Für die Präparation des His-CBF1-BTD Fusionsproteins wurde der Expressionsvektor in *E.coli* Rosetta (Novagen) transformiert auf Kanamycin Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert. Nach 24 h wurde eine Vorkultur mit einer Einzelzellkolonie der transformierten Bakterien angeimpft. Die Vorkultur wurde verdünnt und bei 37°C bis zu einer Dichte von OD₅₉₅ = 0,8 geschüttelt (P2). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression des His-CBF1-BTD-Fragments mit 1 mM IPTG induziert und die Temperatur auf 30°C gesenkt. Nach 4 h wurde erneut eine Probe genommen (P3), die Bakterien geerntet und das Pellet in eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in Lysepuffer entsprechend 1:10 des Kulturvolumens aufgenommen und die Proteine im Branson Digital Sonifier W-250 D unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospritze auf Eis sonifiziert (2x5 min, Amplitude von 20%) solubilisiert. Anschließend wurde erneut eine Probe (P4) genommen, die ebenso wie das Bakterienlysat durch Zentrifugation bei 16000 g für 20 min in das Lysat (P4L) und die unlöslichen Bestandteile die im Pellet (P4P) verbleiben aufgeteilt wurden. Das klare Bakterienlysat wurde mit äquilibrierter Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*) - Agarose über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine Chromatographie - Säule (BioRad)

geladen. Die Säule wurde mit Lysepuffer gewaschen bis kein Protein im Durchfluss nachweisbar ist, bevor das Protein mit Lysepuffer plus 250 mM Imidazol, unter neutralem pH eluiert wurde. Anschließend erfolgte die Dialyse der Proteine für 3x2 h bei 4°C gegen Dialysepuffer.

Die Expressionsvektoren für GST-Tag-Fusionsproteine wurden in *E.coli* BL21 Bakterien (Stratagene) transformiert, auf Ampicillin Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert. Wie bei den His-Fusionsproteinen erfolgte die Präparation aus einer Einzelzellkolonie. Allerdings wurde die Expression der Proteine bei einer Dichte von $OD_{595} = 0,8$ der Bakterienkultur mit 0,5 mM IPTG für 2 h bei 30°C induziert. Die Solubilisierung der GST-Fusionsproteine erfolgte ebenfalls wie bei den His-Fusionsproteinen. Das klare Bakterienlysat wurde mit äquilibrierter Gluthation-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine Chromatographie-Säule (BioRad) geladen. Die Säule wurde mit Lysepuffer gewaschen bis kein Protein im Durchfluss nachweisbar ist, bevor das Protein mit Lysepuffer plus 50 mM reduziertem Gluthathion, unter neutralem pH eluiert wurde. Auch die Aufreinigung der GST Fusionsproteine wurde durch Entnahme von Proben dokumentiert.

Die genommenen Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele für den Nachweis der Proteine mit Coomassie gefärbt.

Lysepuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 M Harnstoff; 1x Complete Proteinase-Inhibitor (Roche) frisch hinzufügen
Dialysepuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTT; 10 mM EDTA (pH 8)

3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte spektrometrisch unter Anwendung des Bradford-Assay. Diese Nachweismethode beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), dass in einer sauren Lösung, die Coomassie Brilliant Blue enthält, das Absorptionsmaximum nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 495 nm auf 595 nm verschoben wird. Für den Nachweis wurden in einer Küvette 1-3 µl der Probe mit 1 ml einer 1:5 verdünnten Bradford-Lösung gemischt und die Extinktion gegen einen entsprechenden Leerwert bei 595 nm gemessen. Parallel wurde eine Eichkurve mit 2, 4, 6, 8 und 10 µg BSA (Rinder-Serumalbumin) erstellt. Anhand der ermittelten Werte der BSA-Standardkurve konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

Bradford-Lösung:	0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% Ethanol; 8,5% Phosphorsäure
-------------------------	--

3.4.5 Reduzierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die vertikale, diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, die SDS als Detergenz enthält (Laemmli, 1970). SDS wirkt als denaturierendes anionisches Detergenz, das an Proteine proportional zu deren Molekulargewicht bindet. Durch seine negative Partialladung wird der gerichtete Lauf der Proteine im elektrischen Feld ermöglicht. Des Weiteren wird das Laufverhalten der Proteine auch durch ihre Aminosäurezusammensetzung beeinflusst, was zur Folge hat, dass mit dieser Methode nur das scheinbare Molekulargewicht bestimmt wird. Es wurden 8 bis 15%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele aus einer 30% (w/v) Acrylamidlösung gegossen. Die Probe wurde in der entsprechenden Menge 2x oder 5x Laemmli-Puffer aufgenommen, 10 min bei 95°C gekocht und auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte pro Gel bei 25 mA für ca. 60 min in 1xSDS Laufpuffer bei Raumtemperatur.

2xLaemmli-Puffer:	4% SDS; 20% Glycerol; 120 mM Tris/HCl pH 6,8; 5% Mercaptoethanol; 2,8 ml H ₂ O; Spatelspitze Bromphenol-Blau
5xLaemmli-Puffer:	10% SDS; 50% Glycerin; 12,5% β-Mercaptoethanol; 300 mM Tris/HCl pH 6,8; Spatelspitze Bromphenolblau
10xSDS-Laufpuffer:	25 mM Tris Base; 200 mM Glycin; 0,1% SDS

3.4.6 Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine, wurden durch Inkubation für ca. 15 min in Coomassie-Lösung unter schütteln gefärbt. Überschüssige Coomassie Lösung und proteinunspezifische Färbung wurde durch mehrfaches waschen der Gele mit Entfärber-Lösung entfernt. Anschließend wurden die Gele 30 min unter Vakuum bei 80°C getrocknet.

Coomassie-Lösung:	50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,275% Coomassie-Brilliantlau R250
Entfärber-Lösung:	30% Methanol, 10% Essigsäure

3.4.7 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden nach der SDS-PAGE auf eine spezielle PVDF-Membran transferiert. Dafür wurde das SDS-Gel auf eine PVDF-Membran, die zuvor mit 100%-igem

Methanol aktiviert wurde, gelegt und zwischen 3MM Whatman-Filterpapier in eine Blotting-Apparatur geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 1 h. Im Anschluss wurde die Membran zunächst 30 min bei Raumtemperatur (RT) in Blockpuffer und dann in verdünntem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit PBS/Tween wurde die Membran 1 h bei RT mit dem in Blockpuffer verdünnten, gegen den Isotyp des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper inkubiert und erneut mehrfach mit PBS/Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und kann mit dem „Enhanced Chemiluminescence“ System (ECL™, GE Healthcare) nachgewiesen werden. Das im ECL™ System enthaltene Luminol wird von dem Enzym HRP mit Wasserstoffperoxid oxidiert, so dass Stickstoff und Licht emittiert werden. Die Lichtemission kann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Transferpuffer:	25 mM Tris Base; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol
Blockpuffer:	5% Milchpulver; 50 mM Tris/ HCl pH 7,4; 150 mM NaCl
PBS:	137 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 M KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS/Tween:	0,05% Tween 20 in PBS

3.4.8 Gel-Retardationsanalysen

Zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen wurden Gel-Retardationsanalysen, die auch als EMSAs („*electro mobility shift assays*“) bezeichnet werden, durchgeführt. Die Methode basiert auf der Beobachtung eines veränderten Migrationsverhaltens von Protein-DNA-Komplexen in nativen Polyacrylamidgelen im Vergleich zu freier, ungebundener DNA (Fried & Crothers, 1981). Die radioaktive Markierung der eingesetzten DNA-Fragmente ermöglicht dabei die Detektion der freien oder gebundenen DNA.

3.4.8.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die Herstellung radioaktiv markierter doppelsträngiger DNA-Fragmente erfolgte mit äquimolaren Mengen von zwei einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotiden (Oligo). Die komplementären Oligos wurden zunächst in Puffer 2 von NEB für 10 min bei 95°C erhitzt und dann langsam bis auf RT abgekühlt. Dieser Vorgang wird als „annealen“ bezeichnet und bewirkt, dass sich die komplementären Oligos beim Abkühlen aneinander lagern. Im Folgenden wurden die Oligos in einer T4-Polynukleotid-Kinase Reaktion (T4-PNK, Fermentas) durch die Übertragung von [γ -³²P] ATP auf das 5'-OH-Ende der Oligonukleotide oder in einer Klenow-Fill-In Reaktion (Klenow Polymerase, Roche) durch den Einbau von [α -³²P] dCTP radioaktiv markiert. Die

Reaktionsansätze wurden wie in Tabelle 15 angesetzt und bei 37°C für 30-60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und einer Inkubation bei 75°C für 10 min abgestoppt.

	Komponente	Volumen/Menge
T4-PNK-Reaktion	DNA	20 pmol
	10xPNK-Puffer	2 µl
	T4-PNK	30 U
	[γ- ³² P] ATP	50 µCi
	mit H ₂ O	auf 20 µl
Klenow-Fill-in-Reaktion	DNA	20 pmol
	10xNEB-Puffer 2	2 µl
	Klenow Polymerase	4 U
	[α- ³² P] dCTP	50 µCi
	dATP, dGTP, dTTP	1000 pmol
	mit H ₂ O	auf 20 µl

Tabelle 15: Die Reaktionsansätze zur Radioaktiven Markierung der Oligos

Die markierten Oligonukleotide wurden im Anschluss über (GE Healthcare) aufgereinigt. Die 20 µl Ansätze wurden mit 30 µl 1xTE verdünnt und auf die Sephadex-Säulen aufgetragen. Die Elution der Oligonukleotide erfolgte durch Zentrifugation für 3 min bei 750 g. Die Höhe der Radioaktivität in der Maßeinheit *counts per minute* (cpm), welche als Anzahl der Zerfälle der Atome pro Minute definiert ist, im Szintillationszähler bestimmt. Parallel wurden äquimolare Mengen der einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotide ohne radioaktive Nukleotide „markiert“. Diese Oligonukleotide wurden für Kompetitionsstudien eingesetzt, um die Spezifität der DNA-Protein Interaktion zu demonstrieren.

3.4.8.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Reaktionsansätze der Gelelektrophorese wurde der Bindemix, Poly-dI-dC, BSA, H₂O und rekombinantes Protein auf Eis vorgelegt. Bei einem „Shift“-Ansatz wurden die Proben mit der radioaktiv markierten DNA versetzt, für 30 min bei RT inkubiert und auf das Gel geladen. Im Falle eines „Supershift“-Ansatzes wurden die Proben mit dem Antikörper für 30 min auf Eis und anschließend mit der radioaktiv markierten DNA für 30 min bei RT inkubiert. Für die Kompetitionsanalyse wurden die Proben mit unmarkierter DNA in 100-fachen Überschuss für 5 min bei RT und anschließend mit der radioaktiv markierten DNA für 30 min bei RT inkubiert. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze ist in Tabelle 16 aufgeführt.

Komponente	Shift	Supershift	Kompetitions-analyse
rekombinantes Protein (1-1000 pmol)	1-5 µl	1-5 µl	1-5 µl
4x Bindepuffer	5 µl	5 µl	5 µl
Poly-dI-dC (1 µg/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
BSA (1 µg/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
Spezifischer Antikörper	-	2 µl	-
unmarkierte DNA (100-facher Überschuss)	-	-	2 µl
Radioaktiv markierte DNA	1000-10000 cpm	1000-10000 cpm	1000-10000 cpm
mit H ₂ O	auf 20 µl	auf 20 µl	auf 20 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung der Reaktionsansätze zur Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte über 6%-ige native Polyacrylamidgele in 1xTBE-Puffer bei 6,5 V/cm für 3-4 h oder 1 V/cm über Nacht. Die Zusammensetzung der nativen Gele ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Komponente	Volumen/Menge
H ₂ O	27,77 µl
10xTBE pH 8,3	4 ml
30% PAA ¹	8 ml
10% APS ²	400 µl
TEMED ³	40 µl

Tabelle 17: Die Zusammensetzung eines 6%-igen Polyacrylamidgeles

¹ PAA: Polyacrylamid; ² APS: Ammoniumpersulfat; ³ TEMED: Tetramethylethylenediamine

Die Gele wurden bei 80°C für 2 h unter Vakuum getrocknet, mit Hilfe eines Röntgenfilmes autoradiographiert oder zur densitometrischen Quantifizierung der Protein-DNA-Komplexe mit einer Verstärkerfolie exponiert. Die Folie wurde im Phosphoimager ausgelesen und die radioaktive Emission mit Hilfe des Programms AIDA quantifiziert.

„Annealing“-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl
Tris/EDTA (TE):	10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA (pH 8); 100 mM NaCl
4xBindepuffer:	40 mM HEPES (pH 7,9); 4 mM EDTA (pH 8); 800 mM KCl; 16% Ficoll
10xTBE:	89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA (pH8,3)

3.4.9 „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Der „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) ist ein auf Antikörpern basierendes Nachweisverfahren, das für die Detektion von Zellen, Viren, Proteinen, Hormonen, Toxinen und Antikörpern aus Blut und anderen heterogenen Lösungen genutzt werden kann. In dieser Arbeit wurde diese Methode sowohl für den Nachweis der Interaktion rekombinanter Proteine verwendet, als auch zur Identifizierung von „small molecules“, die die Interaktion der rekombinanten Proteine inhibieren.

3.4.9.1 ELISA zum Nachweis von Proteininteraktionen

96-Loch „high binding“ ELISA Platten von Costar® wurden ÜN bei 4°C mit 100 µl CBF1 in TBS in einer Konzentration von 100 nM beschichtet und anschließend dreimal mit TBS-T gewaschen. Die als GST-Fusionsproteine exprimierten Interaktionspartner (Kapitel 3.4.3) wurden in Endkonzentrationen von 0,1 nM bis 3200 nM in Puffer B auf die Platten gegeben und für 30min bei RT unter schütteln (400 rpm) inkubiert. Nach erneutem 3-fachem Waschen mit TBS-T wurden die Platten mit dem GST spezifischen Ratte Antikörper GST-6G9, der 1:5 in Milchpuffer verdünnt wurde, für 1 h bei RT und 400 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen, mit dem sekundären Antikörper α-Ratte-IgG-HRP 1 h bei RT und 400 rpm geschüttelt und erneut gewaschen. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte schließlich durch die Zugabe von TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substrat, das von dem an den zweiten Antikörper gekoppelten HRP umgesetzt wird und nach dem Abstoppen mit H₂SO₄ nach max. 20 min zu einem gelben Farbumschlag führt. Dieser Farbumschlag ist proportional zur Menge des gebundenen Proteins. Die Absorption wurde im Tecan Sunrise™ ELISA-Platten Lesegerät bei 450 nm gemessen.

TBS:	150mM NaCl; 7,7mM Tris/HCl, pH 8,0
TBS-T:	150mM NaCl; 7,7mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1% Tween
Puffer B:	150mM NaCl; 7,7mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1% Tween; 0,1% BSA; 5mM DTT
Milchpuffer:	150mM NaCl; 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 5% Milchpulver

3.4.9.2 Nachweis der Inhibition von Proteininteraktionen im ELISA

Die Beschichtung der ELISA Platten mit CBF1 erfolgte wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Die GST gekoppelten Interaktionspartner wurden in einer Endkonzentration von 10 nM (RAMANK) oder 100 nM (EBNA2) zunächst in einer separaten Mikrotiterplatte mit einem inhibitorischen Peptid

oder mit „small molecules“ aus unterschiedlichen „small molecule“-Banken in Puffer B gemischt. Das Peptid, das von vIRF4 abgeleitet ist, lag in einer Endkonzentration von 25 μM vor und die Endkonzentrationen der „small molecules“ waren im μM Bereich. Die Mischung aus GST gekoppeltem Interaktionspartner und inhibitorischem Peptid oder „small molecules“ wurde auf die mit CBF1 beschichtete ELISA Platte überführt und die Platte wurde bei RT und 400 rpm für 30 min inkubiert. Die Detektion erfolgte wie zuvor in Kapitel 3.4.9.1.

3.4.10 Affinitätspräzipitationen

3.4.10.1 Peptid-Affinitätspräzipitation

Zunächst wurde das Peptid an Beads gekoppelt. Dafür wurden 400 μl Pierce® Streptavidin Agarose Beads dreimal in PBS/Tween gewaschen. 100 μg Peptid wurden in 400 μl PBS resuspendiert und zu den gewaschenen Beads gegeben. Nach 3 h Inkubation unter Rollen bei RT wurden die Beads erneut dreimal mit PBS/Tween gewaschen und anschließend in 400 μl PBS aufgenommen. Direkt vor der Affinitätspräzipitation wurden die gekoppelten Beads in Puffer D äquilibriert und auf eine 50% Lösung eingestellt. Für jeden Ansatz wurden 40 μl Beads mit 500 pmol Protein gemischt und mit Puffer D auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte ÜN unter Rollen und bei 4°C. Anschließend wurden die Beads erneut dreimal gewaschen und in 40 μl Lämmli Puffer aufgenommen. Jeweils 10 μl der Präzipitate wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und durch Westernblot analysiert.

PBS: 137 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na_2HPO_4 ; 1,5 M KH_2PO_4 pH 7,4

PBS/Tween: 0,1% Tween in PBS

Puffer D: 300 mM KCl; 20 mM HEPES pH 7,9; 0,2 mM EDTA; 0,2% Tween; 25% v/v Glycerol

3.4.10.2 GST-Affinitätspräzipitation

Die Expressionsvektoren für GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* BL21 Bakterien (Stratagene) transformiert auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert. Nach 24 h wurde mit einem Klon eine Flüssigkultur angeimpft, bis zu einer Dichte von $\text{OD}_{595} = 0,8$ bei 37°C kultiviert und mit 0,5 mM IPTG für 2 h bei 30°C induziert. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in Lysepuffer resuspendiert. Die Bakterienlysate wurden im Branson Digital Sonifier W-250 D unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospritze auf Eis sonifiziert (2x5 min, Amplitude von 20%).

Nach einem Zentrifugationsschritt von 20000 g für 20 min wurde das klare Bakterienlysat mit äquilibrierter Glutathion - Sepharose ÜN bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Jeweils 30 µl der mit den unterschiedlichen GST-Fusionsproteinen oder mit dem GST-Protein gekoppelten Glutathion-Sepharose Beads bzw. nicht gekoppelten Glutathion-Sepharose Beads wurden mit 250 pmol des His-CBF-BTD-Fusionsproteins bei 4°C ÜN inkubiert, mehrfach gewaschen und in 40 µl Lämmli Puffer aufgenommen. 10% des CBF1 Inputs sowie 25% der Präzipitate wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot nachgewiesen.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, Testsysteme zu entwickeln, die es ermöglichen, im Hochdurchsatz (HTS) „small molecule“-Banken auf Substanzen zu durchsuchen („screenen“), welche entweder die CBF1/Notch-Interaktion oder die CBF1/EBNA2-Interaktion verhindern können oder die von CBF1-abhängige Transaktivierung durch EBNA2 hemmen. Als mögliche Testverfahren für die Identifizierung eines Inhibitors eignen sich sowohl biochemische Methoden als auch zellbasierte Systeme.

Kapitel 4.1 (S. 60) beschreibt die Expression der Fragmente von CBF1, Notch und EBNA2, welche für die Etablierung einer ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“)-basierten Testmethode zur Identifizierung von Inhibitoren der CBF1/Notch- und CBF1/EBNA2-Interaktion verwendet werden sollten. Im Anschluss an die Expression der Proteinfragmente wurde mittels Affinitätspräzipitationen und EMSA („electrophoretic mobility shift assay“) überprüft, ob diese Proteinfragmente zu einer Interaktion fähig sind.

Kapitel 4.2 (S. 76) beschäftigt sich mit der Etablierung der Versuchsbedingungen für das ELISA-basierte Testsystem. Anschließend wurde kontrolliert, ob sich das biochemische System unter den gewählten Versuchsbedingungen für einen „small molecules screen“ im Hochdurchsatz eignet.

In **Kapitel 4.3** (S. 94) wird die Durchführung eines „small molecule screens“ mit der ELISA-basierten Testmethode am Beispiel der Naturstoffbank NHC beschrieben. Anhand von diesem Beispiel konnte gezeigt werden, dass das biochemische Testsystem auch unter den Versuchsbedingungen eines HTS verlässlich ist.

Kapitel 4.4 (S. 99) dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines zellbasierten Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2. Dieses Testsystem beruht auf einer Indikatorzelllinie und einer Kontrollzelllinie, die hier genauer erklärt werden.

In **Kapitel 4.5** (S. 103) wird beschrieben, welche Versuchsbedingungen für einen „small molecule screen“ im Hochdurchsatz mit dem zellbasierten Testsystem notwendig sind und ob sich das Testsystem unter den gewählten Reaktionsbedingungen für einen HTS eignet.

Schließlich zeigt **Kapitel 4.6** (S. 112) am Beispiel der Naturstoffbank NHC einen „small molecule screen“ mit dem zellbasierten Testsystem. Es konnten mehrere potentiell inhibitorische Moleküle identifiziert werden, deren inhibitorische Eigenschaften in weiteren Kontroll-experimenten überprüft wurden.

4.1 Biochemisches Testsystem zur Identifizierung inhibitorischer „small molecules“

Als biochemisches Testsystem sollte eine ELISA-basierte Methode verwendet werden. Dafür war es notwendig, die einzelnen Interaktionspartner CBF1, Notch und EBNA2 als Fusionsproteine zunächst rekombinant zu exprimieren und aufzureinigen. Um spezifische Inhibitoren für die Interaktion der hydrophoben Tasche von CBF1 mit dem WxP-Motiv von Notch oder EBNA2 zu identifizieren, wurden Fragmente der Interaktionspartner verwendet. Die gewählten Proteinfragmente sollten einerseits in *E.coli* Bakterien in ausreichenden Mengen exprimiert werden. Andererseits sollte es möglich sein, die Fragmente auch unter nativen Bedingungen aufzureinigen, um eine möglichst hohe biologische Aktivität zu gewährleisten. Weitere Kriterien für die Wahl der Proteinfragmente waren eine möglichst hohe Stabilität der Proteine während und nach der rekombinanten Expression, sowie die Fähigkeit zu spezifischen Protein/Protein-Wechselwirkungen der Interaktionspartner.

4.1.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von Fragmenten der Interaktionspartner

Expression eines CBF1-Fragments als Histidin-Fusionsprotein

Da die Kristallstruktur von CBF1 bekannt ist (Kovall & Hendrickson, 2004), wurden diejenigen Aminosäuren von CBF1 verwendet, die in der dreidimensionalen Struktur die BT-Domäne und somit die darin enthaltene hydrophobe Bindetasche ausbilden. Diese Bindetasche ist für die Interaktion mit dem WxP-Motiv von Notch (Fuchs et al., 2001; Wilson & Kovall, 2006), EBNA2 (Fuchs et al., 2001; Johnson et al., 2010) und vIRF4 (Heinzelmann et al., 2010) notwendig. Die bekannte Tertiärstruktur diente als Grundlage für die Entscheidung, welche Aminosäuren für ein Fragment verwendet werden sollen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass wichtige Domänen, die durch die Faltung des Proteins entstehen, unterbrochen werden und Überhänge entstehen, die das Protein destabilisieren. Ausgehend von dem humanen Transkript 2 wurden die Aminosäuren (AS) 158-323 in einen Vektor kloniert, der für einen N-terminalen, sechsfachen Histidin (His)-Tag und einen Z-Tag (Z-Domäne des Proteins A von *Staphylococcus aureus*) codiert. Der His-Tag wurde für die Aufreinigung des Proteinfragments über Nickel-NTA Affinitätschromatographie verwendet. Der zusätzliche Z-Tag ermöglicht es, die Löslichkeit des Fusionsproteins zu erhöhen (Peti & Page, 2007). Das resultierende Fusionsprotein Hi-CBF1-BTD

besteht zum größten Teil aus der BTD-Domäne von CBF1, beinhaltet 259 AS und hat ein apparentes Molekulargewicht von 29,3 kDa. Abbildung 8 zeigt nochmal die Verteilung der CBF1-Domänen in linearer Darstellung (A) und in der Kristallstruktur (C). Im Vergleich dazu sind die Aminosäuren, welche für das His-CBF1-BTD-Fragment kloniert wurden, in den Abbildung 8B und D dargestellt.

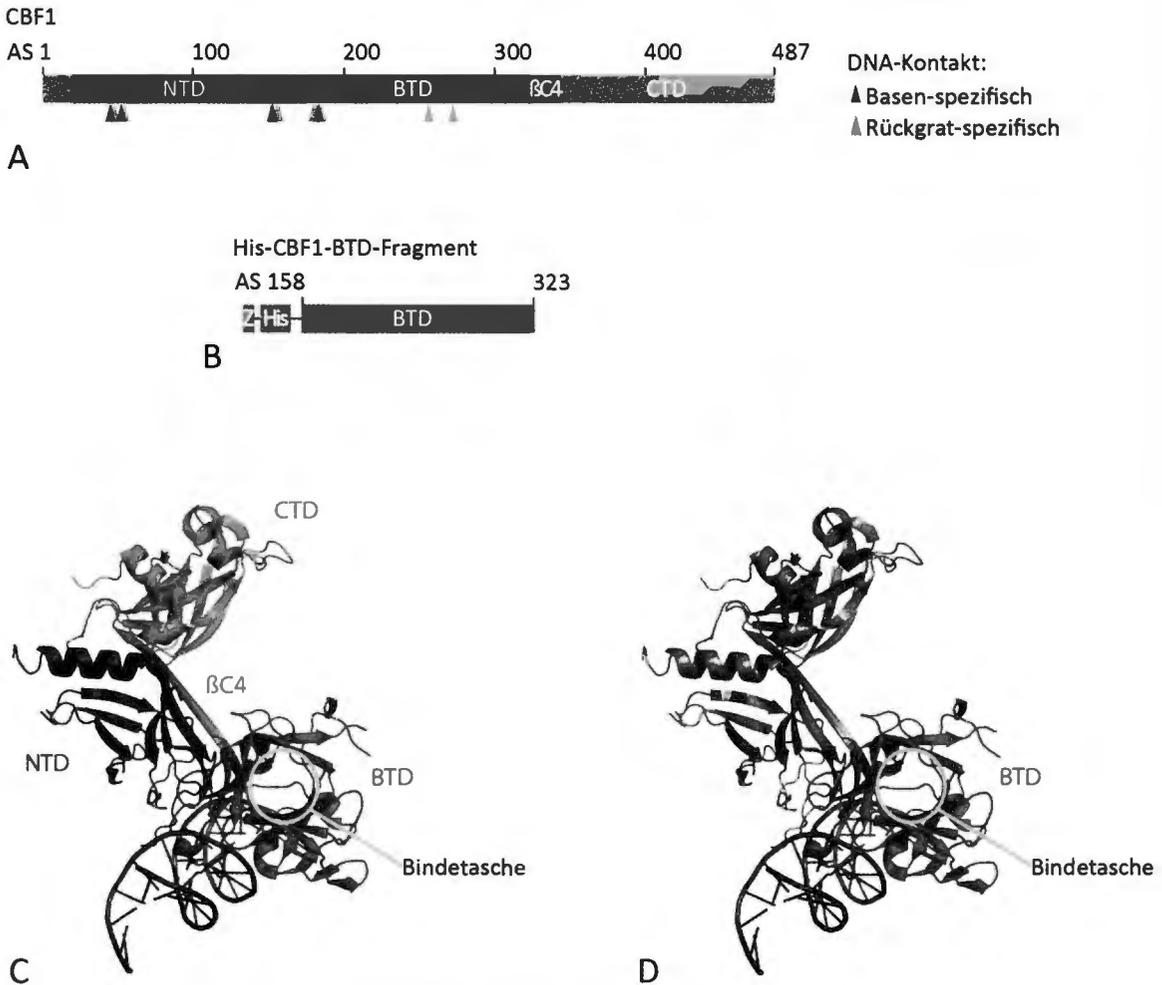


Abbildung 8: Darstellung von CBF1 und dem His-CBF1-BTD-Fragment

Lineare Darstellung des Proteins CBF1 (A) und eines CBF1-Fragments (AS 158-323) (B), das mit einem N-terminalen Z-Tag (Z-Domäne des Proteins A aus *S.aureus*) und Histidin-Tag (His-Tag) exprimiert wurde. Der Z-Tag ermöglicht eine bessere Löslichkeit des Proteins und der His-Tag wurde für die Aufreinigung verwendet. (C) zeigt die von Kovall und Hendrickson veröffentlichte Kristallstruktur mit den durch Faltung entstehenden Domänen und der hydrophoben Bindetasche innerhalb der BTD-Domäne (Kovall & Hendrickson, 2004). In (D) sind die Aminosäuren innerhalb der Tertiärstruktur markiert, welche für die Expression des His-CBF1-BTD-Fragments verwendet wurden.

Um die Ausbeute des löslichen His-CBF1-BTD-Fragments zu verbessern, wurde die heterologe Expression in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS durchgeführt. Dieser Bakterienstamm kodiert für sechs zusätzliche tRNAs (pRARE), die für die Expression eukaryotischer Proteine notwendig sein könnten (Novagen). Die genaue Vorgehensweise der nativen Präparation des Histidin Fusionsproteins aus einer Einzelzellkolonie beschreibt Kapitel 3.4.3 (S. 50). Abbildung 9 zeigt das mit Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der während der Präparation genommenen Proben. Als Referenzen dienen einerseits der Marker in Spur 1 sowie 1 µg und 2 µg BSA („bovine serum albumin“) in den Spuren 2 und 3. In den Spuren 4 bis 6 wurden Laemmli-Lysate der Bakterien aufgetragen. Um die Proteinmengen in den Laemmli-Lysaten vergleichen zu können, wurde die Menge des Laemmli-Puffers an die Dichte der Bakterien angepasst. Nicht transformierte Bakterien (Spur 4) und transformierte Bakterien vor Induktion der Proteinexpression mit IPTG (Spur 5) zeigen ein ähnliches Bandenmuster. Nach Induktion der Proteinexpression (Spur 6) entsteht eine markante Bande auf der Höhe, die dem apparenten Molekulargewicht von His-CBF1-BTD entspricht. Durch die Lyse der Bakterien, die Solubilisierung der Proteine und den anschließenden Zentrifugationsschritt erhält man zwei Fraktionen des Proteins. Ein Teil konnte gelöst werden und befindet sich im Lysat (Spur 7), der andere Teil, der ca. der doppelten bis 3-fachen Menge des gelösten Proteins entspricht, bleibt unlöslich und verbleibt im Pellet (Spur 10). Die Proteinmengen in den Spuren 7 und 10 können miteinander verglichen werden, da gleiche Anteile von Lysat und Pellet mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Spuren 8 und 9 zeigen die Eluate 1 und 2 des gereinigten Proteins nach der Dialyse. Es ist jeweils nur eine Bande zu erkennen, was dafür spricht, dass dieses Protein während der Aufreinigung nicht degradiert. Die Ausbeute von gereinigtem Protein aus einem Liter Bakterienkultur wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradford-Lösung ermittelt (Kapitel 3.4.4, S. 51) und beträgt 15-20 mg aufgereinigtes Protein pro Liter Bakterienkultur. Diese Proteinmenge ist für folgende Versuche ausreichend, so dass die große Proteinmenge von His-CBF1-BTD, die im Pellet bleibt, kein Problem darstellt.

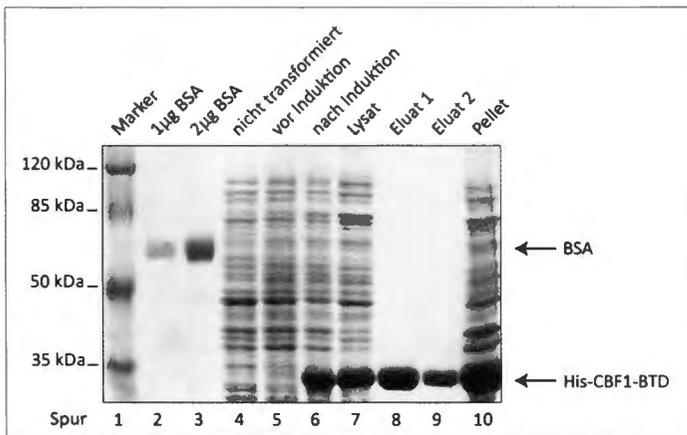


Abbildung 9: Dokumentation der Expression und Aufreinigung des His-CBF1-BTD-Fragments

Die Präparation des His-CBF1-BTD-Fragments erfolgte aus einer Einzelzellkolonie unter nativen Bedingungen. Um die Expression und Aufreinigung des Proteins zu dokumentieren, wurden gleiche Volumenanteile der genommen Proben und der Eluate mittels Gelelektrophorese auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spur 1 zeigt den Marker und Spuren 2 und 3 zeigen 1 bzw. 2 µg BSA als Referenz. Spuren 4 bis 6 zeigen vergleichbare Mengen von Laemmli-Lysaten der nicht transformierten Bakterien, sowie von Bakterien vor und nach Induktion mit 1 mM IPTG. Spuren 7 und 10 zeigen vergleichbare Anteile der Proteine, die sich im Lysat und im Pellet befinden. Spuren 8 und 9 zeigen die Eluate des aufgereinigten His-CBF1-BTD-Proteins nach der Dialyse.

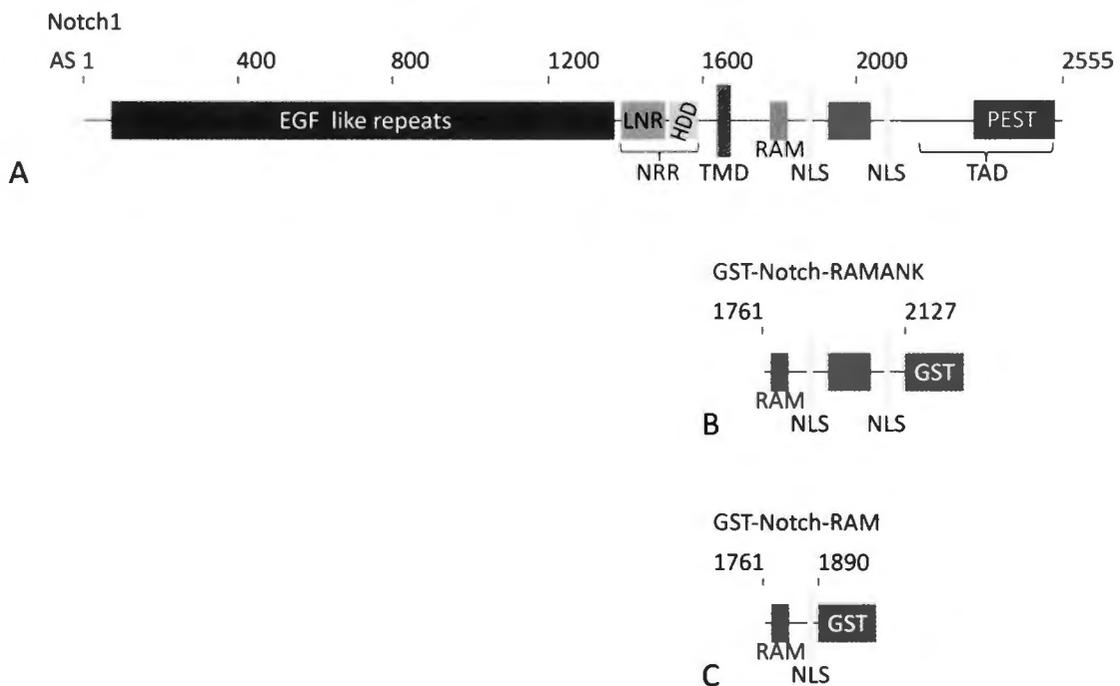
Expression und Aufreinigung von Fragmenten der CBF1-Interaktionspartner Notch und EBNA2 als GST-Fusionsproteine

Sowohl Notch als auch EBNA2 interagieren über ihr WxP-Motiv mit der hydrophoben Bindetasche von CBF1. Aus diesem Grund wurden für die heterologe Expression von beiden Proteinen solche Fragmente ausgewählt, die das WxP-Motiv beinhalten. Für das zelluläre Protein Notch wurde gezeigt, dass nur die intrazellulären Domänen RAM und ANK mit CBF1 interagieren (Nam et al., 2006; Wilson & Kovall, 2006). Dabei ist besonders die RAM-Domäne von großer Bedeutung, da sie das WxP-Motiv enthält, das für die CBF1-Bindung essentiell ist (Kovall & Hendrickson, 2004). Für die heterologe Expression wurden zwei Notch-Fragmente ausgewählt. Das erste besteht aus den Aminosäuren 1761-2127 mit den Domänen RAM und ANK, die beide mit CBF1 interagieren; das zweite Fragment beinhaltet die Aminosäuren 1761-1890 mit der RAM-Domäne, die das essentielle WxP-Motiv aufweist.

EBNA2 wurde einerseits aufgrund von Bindungsstudien in mehrere funktionelle Domänen und andererseits durch den Vergleich unterschiedlicher EBNA2-Varianten in mehrere konservierte

Regionen (CR) unterteilt. Die Domäne, welche für die Bindung an DNA-Bindeadapter notwendig ist, befindet sich zwischen den Aminosäuren 284-341 und beinhaltet die konservierten Regionen CR5 und CR6. Die konservierte Region CR6, die ein WxP-Motiv enthält, ist essentiell für die Bindung an CBF1 (Übersicht: Kempkes, 2010). Für die heterologe Expression wurden zwei EBNA2-Fragmente ausgewählt. Das erste Fragment besteht aus den Aminosäuren 277-342, welche die konservierten Regionen CR5 und CR6 beinhalten; das zweite Fragment besteht aus den Aminosäuren 310-342 und enthält nur die konservierte Region CR6 mit dem essentiellen Bindemotiv WxP.

Die Fragmente von Notch und EBNA2 wurden in einen Vektor kloniert, der für einen C-terminalen GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) kodiert. Der GST-Tag ermöglicht im Weiteren die Aufreinigung der Fusionsproteine über Glutathion-Affinitätschromatographie. Das Fragment GST-Notch-RAMANK besteht aus 581 AS und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 65,4 kDa; das Fragment GST-Notch-RAM besteht aus 365 AS und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 42 kDa. Das Fragment GST-EBNA2-CR5+6 besteht aus 299 AS und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 34,2 kDa; das Fragment GST-EBNA2-CR6 besteht aus 267 AS und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 31 kDa.



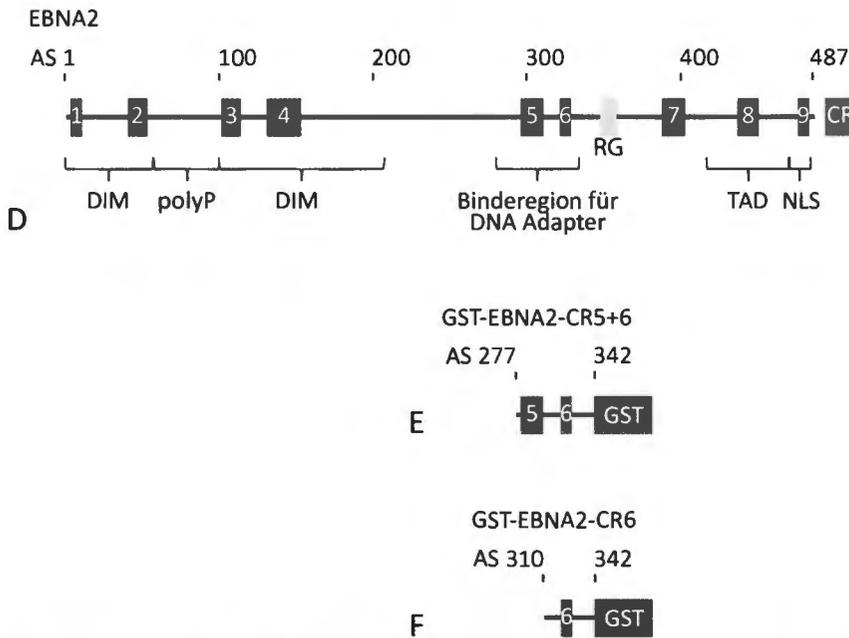


Abbildung 10: Fragmente der CBF1-Interaktionspartner zur bakteriellen Expression mit C-terminalem GST-Tag

Alle Fragmente der Interaktionspartner von CBF1 wurden mit einem C-terminalen GST-Tag exprimiert. Die Fragmente zur bakteriellen Expression von Notch beschränken sich auf Domänen des intrazellulären Teils des Notch-Rezeptors **(A)**. Das größere Fragment, das aus den Aminosäuren 1761-2127 besteht und die Domänen RAM und ANK beinhaltet, ist in **(B)** dargestellt. **(C)** zeigt das kleinere Fragment von Notch, das aus den Aminosäuren 1761-1890 besteht, welche die RAM-Domäne mit dem WxP-Motiv für die Bindung in die hydrophobe Tasche von CBF1 beinhaltet. Von dem viralen Protein EBNA2 **(D)** wurden ebenfalls Fragmente für die heterologe Expression ausgewählt. Das in **(E)** abgebildete Fragment beinhaltet die konservierten Regionen CR5 und CR6. Das Fragment in **(F)** enthält nur die konservierte Region CR6, die das für die Bindung an CBF1 notwendige WxP-Motiv beinhaltet.

Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurden Bakterien des Stammes *E.coli* BL21(DE3) pLysS verwendet. Die Vorgehensweise der nativen Präparation von GST-Fusionsproteinen aus einer Einzelzellkolonie erläutert Kapitel 3.4.3 (S. 50) werden. Abbildung 11 zeigt die mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgele zur Analyse der Proben, welche die Expression und Aufreinigung der GST Fusionsproteine von Notch und EBNA2 dokumentieren. Als Referenzen dienen jeweils die Spur 1 mit dem Marker und Spuren 8 und 9 mit 1 bzw. 2 µg BSA. In den Spuren 2 und 3 wurden Laemmli-Lysate der Bakterien aufgetragen. Um die Proteinmengen in den Laemmli-Lysaten vergleichen zu können, wurde die Menge des Laemmli-Puffers an die Dichte der Bakterien angepasst. Durch die Lyse der Bakterien, die Solubilisierung der Proteine

und den anschließenden Zentrifugationsschritt erhält man zwei Fraktionen des Proteins. Ein Teil konnte gelöst werden und befindet sich im Lysat (Spur 4), der andere Teil bleibt unlöslich und verbleibt im Pellet (Spur 5). Die Proteinmengen in den Spuren 4 und 5 können miteinander verglichen werden, da gleiche Anteile von Lysat und Pellet mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Spuren 6 und 7 zeigen die Eluate 1 und 2 der gereinigten Proteine. Abbildung 11 A zeigt die Expression und Aufreinigungen von GST-Notch-RAMANK. Nach Induktion der Proteinexpression (Spur 3) ist deutlich mehr Protein vorhanden als vor der Induktion (Spur 2). Allerdings entstehen Banden nicht nur auf Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von GST-Notch-RAMANK von 65,4 kDa, sondern auch in dem Bereich von 20-30 kDa. Nach der Lyse und Solubilisierung erscheint mehr als die Hälfte der induzierten Proteine im Lysat (Spur 4) und nicht im Pellet (Spur 5). Die Eluate in Spur 6 und 7 zeigen, dass Proteine aufgereinigt wurden, welche das Molekulargewicht von GST-Notch-RAMANK, aber auch ein geringeres Molekulargewicht von 20-30 kDa haben. Vermutlich sind diese kleineren Proteine degradierte Fragmente des GST-Fusionsproteins, die bereits während der Expression entstehen und aufgrund eines intakten GST-Tags aufgereinigt werden. Der Anteil der degradierten Fraktion von GST-Notch-RAMANK beträgt etwa die Hälfte der Gesamtmenge des aufgereinigten Proteins. Abbildung 11 B zeigt die Expression und Aufreinigungen von GST-Notch-RAM. Nach Induktion der Proteinexpression (Spur 3) ist deutlich mehr Protein vorhanden als vor der Induktion (Spur 2). Allerdings entstehen auch hier zusätzliche Banden, die sich nicht auf Höhe des apparenten Molekulargewichts von GST-Notch-RAM von 42 kDa befinden, sondern in dem Bereich von 20-40 kDa liegen. Nach der Lyse und Solubilisierung erscheint auch bei diesem GST-Fusionsprotein von Notch mehr als die Hälfte der induzierten Proteine im Lysat (Spur 4) und nicht im Pellet (Spur 5). Die Elution führte schließlich zu mehreren Proteinen (Spuren 6 und 7), die das Molekulargewicht von GST-Notch-RAM von 42 kDa aufweisen, aber auch zu weiteren kleineren Fragmenten von 20-40 kDa. Auch hier sind diese kleineren Proteine vermutlich degradierte Fragmente des GST-Notch-RAM-Fusionsproteins, die bereits während der Expression entstehen und aufgrund eines intakten GST-Tags aufgereinigt werden. Der Anteil der degradierten Fraktion von GST-Notch-RAM beträgt etwa drei Viertel der Ausbeute. Abbildung 11 C zeigt die Expression und Aufreinigung von GST-EBNA2-CR5+6. Nach Induktion der Proteinexpression (Spur 3) ist etwas mehr Protein vorhanden als vor der Induktion (Spur 2). Durch Lyse und Solubilisierung befindet sich mehr als die Hälfte der induzierten Proteine im Lysat (Spur 4) und nicht im Pellet (Spur 5). Nach der Elution ist zu erkennen, dass ein Protein, welches das Molekulargewicht von GST-EBNA2-CR5+6 von 34,2 kDa aufweist, angereichert wurde (Spuren 6 und 7). In Abbildung 11 D schließlich sind die Schritte der Expression und Aufreinigung von GST-EBNA2-CR6 dargestellt.

Nach Induktion der Proteinexpression (Spur 3) ist weitaus mehr Protein vorhanden als vor der Induktion (Spur 2). Nach der Lyse und Solubilisierung sind zwei Drittel der induzierten Proteine im Lysat (Spur 4) und nicht im Pellet (Spur 5). Die Eluate zeigen ein Protein, welches das Molekulargewicht von GST-EBNA2-CR6 von 34,2 kDa aufweist (Spuren 6 und 7). Die Ausbeute von gereinigtem Protein aus einem Liter Bakterienkultur wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Lösung (Kapitel 3.4.4) bestimmt und beträgt für GST-Notch-RAMANK 10 mg, für GST-Notch-RAM 8 mg, für GST-EBNA2-CR5+6 3 mg und für GST-EBNA2-CR6 11 mg. Es muss jedoch beachtet werden, dass im Fall der GST-Fusionsproteine von Notch auch die degradierten Proteinfragmente in diesen Proteinmengen enthalten sind.

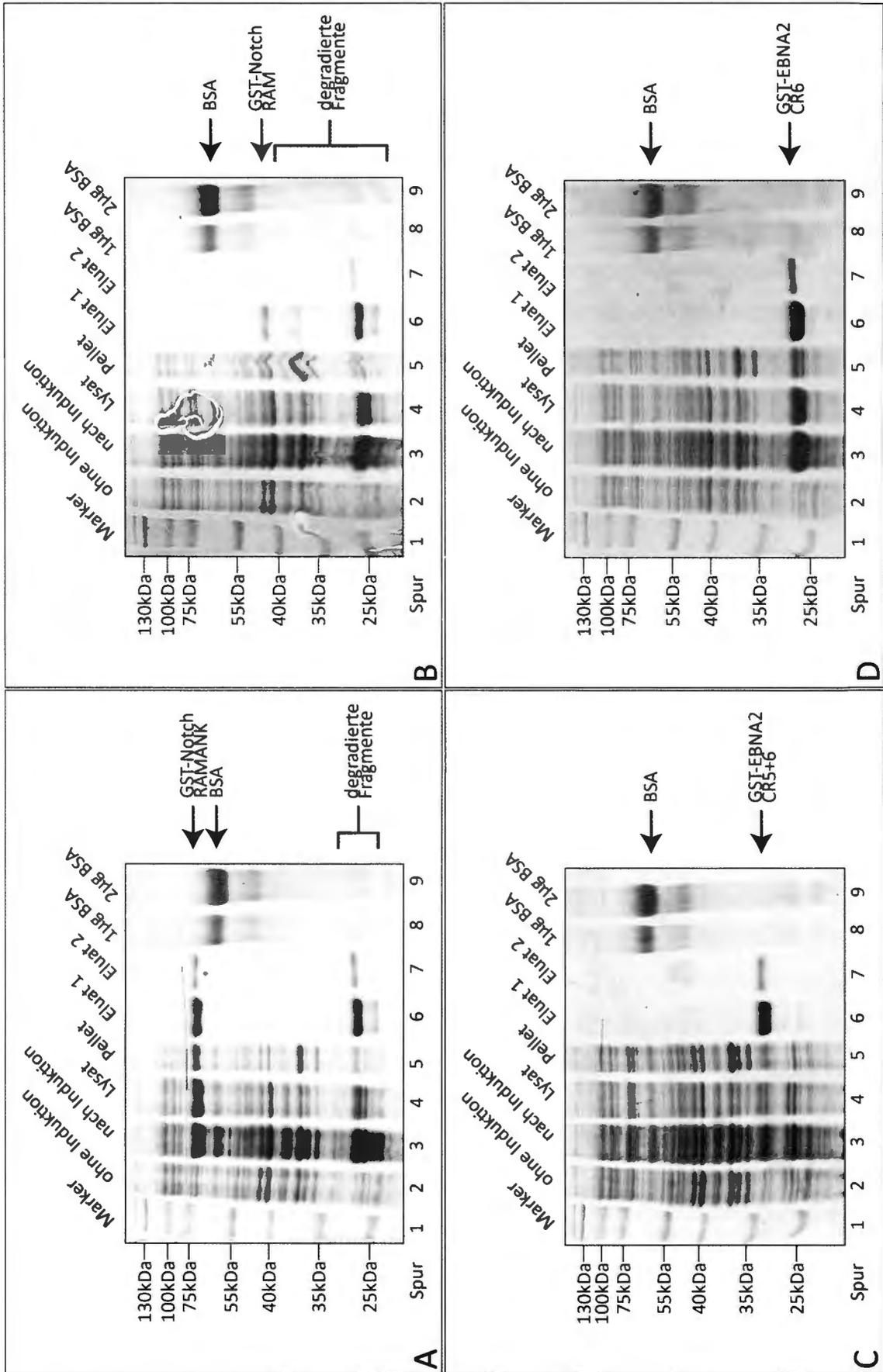


Abbildung 11: Coomassie Gele zur Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Die Präparation von GST-Notch-RAMANK (A), GST-Notch-RAM (B), GST-EBNA2-CR5+6 (C) und GST-EBNA2-CR6 (D) erfolgte jeweils aus einer Einzelzellkolonie unter nativen Bedingungen. Um die Expression und Aufreinigung der Proteine zu dokumentieren wurden gleiche Volumenanteile der genommenen Proben und der Eluate mittels Gelelektrophorese auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spur 1 zeigt den Marker und Spuren 8 und 9 zeigen 1 µg bzw. 2 µg BSA als Referenz. Spuren 2 und 3 zeigen vergleichbare Mengen von Laemmli-Lysaten von Bakterien vor und nach Induktion mit 0,5 mM IPTG. Spuren 4 und 5 zeigen vergleichbare Anteile der Proteine, die sich im Lysat und im Pellet befinden. Spuren 6 und 7 zeigen die Eluate der aufgereinigten Proteine.

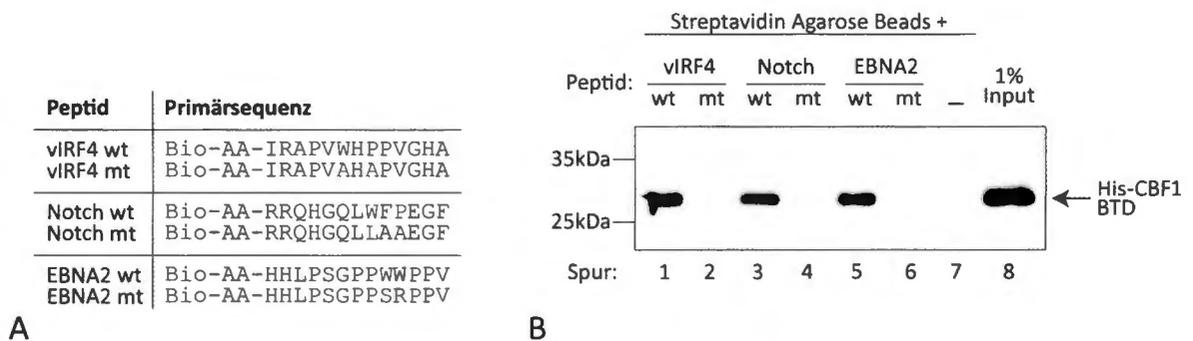
4.1.2 Sind die Fragmente von CBF1, Notch und EBNA2 biologisch aktiv?

Bevor die Fragmente von CBF1, EBNA2 und Notch für die Etablierung eines Hochdurchsatz-Verfahrens zur Identifizierung inhibitorischer Moleküle verwendet wurden, sollte ihre biologische Aktivität überprüft werden. Diese biologische Aktivität beruht auf Protein/Protein-Wechselwirkungen, die im Folgenden untersucht wurden.

Das Proteinfragment His-CBF1-BTD kann Peptide von Notch, EBNA2 und vIRF4, die das Bindemotiv WxP enthalten, binden

Das Fragment von CBF1 wurde so gewählt, dass es aus den Aminosäuren besteht, die die hydrophobe Bindetasche für Notch, EBNA2 und vIRF4 bilden. Zunächst sollte gezeigt werden, dass das His-CBF1-BTD-Fragment in der Lage ist Peptide zu binden, die das WxP-Motiv enthalten, das mit der hydrophoben Tasche der BTD-Domäne von CBF1 interagiert. Um die Bindung des His-CBF1-BTD-Fragments zu überprüfen, wurden 13 AS lange Peptide der Proteine Notch, EBNA2 und vIRF4 verwendet. Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung dienten Peptide von Notch, EBNA2 und vIRF4 in denen das WxP-Motiv durch andere Aminosäuren ausgetauscht wurde. Die Funktionalität bzw. Inaktivität dieser Peptide wurde bereits beschrieben (Notch wt (Lubman et al., 2007); Notch mt (Tamura et al., 1995); EBNA2 (Farrell et al., 2004); vIRF4 (Heinzelmann et al., 2010)). Die Primärsequenz der Peptide ist in Abbildung 12 A dargestellt. Um Affinitätspräzipitationen durchzuführen, sind alle Peptide von unseren Kooperationspartnern aus der Arbeitsgruppe von Ronald Frank am HZI in Braunschweig mit einem N-terminalen Biotin-Tag und zwei Alaninen (AA) als Abstandshalter synthetisiert worden. Der verwendete Biotin-Tag kann eine sehr starke, nicht kovalente Bindung zu Streptavidin eingehen, die nicht reversibel ist. Diese starke Bindung wurde für die Kopplung der biotinylierten Peptide an Pierce® Streptavidin

Agarose Beads ausgenutzt und die gekoppelten Beads wurden für die Affinitätspräzipitation von CBF1 verwendet. Die Durchführung der Affinitätspräzipitation kann in Kapitel 3.4.10.1 (S. 57) nachgelesen werden. Jeweils ein Viertel des Präzipitats wurde mittels SDS-PAGE unter Verwendung eines 10%-igen Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Westernblot auf eine PVDF-Membran transferiert und das gebundene His-CBF1-BTD-Fragment mit dem Histidin-spezifischen Antikörper (N-His-2F12) detektiert. In Abbildung 12 B ist der Westernblot zur Affinitätspräzipitation von His-CBF1-BTD dargestellt. Die Spuren 1, 3 und 5 zeigen, dass das His-CBF1-BTD-Fragment an die Peptide von Notch, EBNA2 und vIRF4 bindet, welche das WxP-Motiv enthalten. In den Spuren 2, 4 und 6 sind die Präzipitationen von His-CBF1-BTD mit den mutierten (mt) Versionen der Peptide aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass keine Bindung des CBF1-Fragments an die Peptide stattfindet, wenn das WxP-Motiv nicht vorhanden ist. His-CBF1-BTD bindet nicht an Pierce® Streptavidin Agarose Beads, an die kein Peptid gekoppelt wurde (Spur 7). In Spur 8 wurde 1% des His-CBF1-BTD-Proteins, welches für die Affinitätspräzipitation verwendet wurde, als Referenz aufgetragen.



A

B

Abbildung 12: Das His-CBF1-BTD-Fragment bindet an Peptide, die von Notch, EBNA2 oder vIRF4 abstammen und das WxP-Motiv beinhalten

(A) zeigt die von vIRF4, Notch und EBNA2 abgeleiteten Peptide, die für die Affinitätspräzipitation von His-CBF1-BTD verwendet wurden. Alle Peptide wurden durch ihren Biotin-Tag an Pierce® Streptavidin Agarose Beads gekoppelt. Die Beads wurden gewaschen und ÜN mit dem rekombinant exprimierten His-CBF1-BTD-Fragment inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Beads in Laemmli-Puffer aufgenommen und aufgekocht. Ein Viertel der Präzipitate wurde mittels SDS-PAGE in einem 10%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot mit dem Histidin-spezifischen Antikörper (α -N-His-2F12) detektiert. Dieser Westernblot ist in (B) dargestellt. Bei allen Peptiden bindet das His-CBF1-BTD-Fragment nur an die wt-Variante (Spuren 1, 3 und 5) und nicht an die mutierten Peptide (Spuren 2, 4, und 6). An nicht gekoppelte Beads findet ebenfalls

keine Bindung statt (Spur 7). In Spur 8 ist 1% des Inputs von His-CBF1-BTD als Referenz aufgetragen.

Die Bindungsaffinität von CBF1 an die vIRF4, Notch und EBNA2 Peptide kann mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da nicht genau bekannt ist, welche Peptidmengen an die Streptavidin Agarose Beads gekoppelt wurden. Vergleicht man die Spuren 1, 3 und 5, scheint das His-CBF1-BTD-Fragment alle Peptide, die das WxP-Motiv enthalten, mit gleicher Intensität zu binden. Insgesamt konnten ca. 2% des eingesetzten His-CBF1-BTD-Fragments durch jedes wt-Peptid präzipitiert werden.

Die Notch- und EBNA2-Proteinfragmente binden in Gel-Retardationsanalysen an CBF1

Die Fähigkeit der GST-Fusionsproteine mit CBF1 zu interagieren, sollte zunächst mit einem rekombinant exprimierten CBF1-Protein in Gel-Retardationsanalysen überprüft werden. Das verwendete CBF1 Protein besteht aus den Aminosäuren 9-487 des Transkriptes 2 und beinhaltet die Domänen CTD, NTD, BTD und β C4. Das Expressionsplasmid für dieses Fusionsprotein wird als VK60 bezeichnet und ist Teil des Laborbestands, so dass die Expressions- und Aufreinigungsbedingungen bekannt waren. Dieses rekombinante CBF1-Protein ist fähig sowohl an DNA als auch spezifisch an Proteine aus Zellextrakten zu binden und somit funktionell. Für die Durchführung der Gel-Retardationsexperimente wurde ein vom C-Promotor (Cp) abgeleitetes Oligonukleotid (Oligo) mit der DNA-Bindesequenz „GTGGGAA“ über eine Kinase-Reaktion radioaktiv markiert. Nach Vorinkubation der Proteine mit dem radioaktiv markierten Cp-Oligo wurden die geformten Komplexe mittels EMSA in einem 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass durch das Cp-Oligo alleine nur eine Bande entsteht (Spur 1). Durch die Zugabe des CBF1-Proteins entsteht ein Protein/DNA-Komplex, der deutlich verzögert durch das Gel wandert (Spur 2). Die Bindung von CBF1 an das Cp-Oligo kann durch die Zugabe eines kompetitiven, nicht radioaktiv markierten Cp-Oligos wieder aufgehoben werden (Spur 3). Diese Inhibition deutet darauf hin, dass die CBF1/DNA-Interaktion spezifisch ist. In Abbildung 13 A wurde das Migrationsverhalten des CBF1/DNA-Komplexes durch die Zugabe von ansteigenden Konzentrationen des Fusionsproteins GST-Notch-RAM (Spuren 4-7) oder GST-Notch-RAMANK (Spuren 8-12) weiter verzögert. In den Spuren 7 und 12 der Abbildung 13 A wurde zu den Protein/DNA-Komplexen ein CBF1-spezifischer Antikörper (RBP-1F1) hinzugefügt, um zu demonstrieren, dass CBF1 in diesen Komplexen vorhanden ist. Aus diesem Gel-Retardationsexperiment lässt sich folgern, dass sowohl das GST-Notch-RAM- als auch das GST-Notch-RAMANK-Protein biologisch aktiv ist und fähig, an CBF1 zu binden. In Abbildung 13 B ist

das Migrationsverhalten des CBF1/DNA-Komplexes nach Zugabe von ansteigenden Konzentrationen der Proteine GST-EBNA2-CR6 (Spuren 4-7) oder GST-EBNA2-CR5+6 (8-12) dargestellt. Die eingesetzten Proteinmengen des Fusionsproteins GST-EBNA2-CR6 (Spuren 4-7) sind jedoch nicht in der Lage, alle CBF1/DNA-Komplexe zu binden. Es bildet sich erneut eine Bande auf der Höhe des CBF1/DNA-Komplexes und zusätzlich entsteht nach der Zugabe des Fusionsproteins eine weitere Bande, welche vermutlich aus einem Komplex von CBF1/GST-EBNA-CR6 und DNA besteht. Eine Steigerung des Signals ist mit ansteigenden Proteinkonzentrationen nicht zu erkennen. Die Zugabe des CBF1-spezifischen Antikörpers führte erneut zur Entstehung von zwei Banden (Spur 7). Es ist anzunehmen, dass die obere Bande aus dem CBF1-spezifischen Antikörper sowie CBF1, GST-EBNA2-CR6 und DNA und die untere Bande aus Antikörper, CBF1 und DNA besteht. Das ist allerdings nur eine Vermutung, da eine Spur, die das Migrationsverhalten von Antikörper mit CBF1 und DNA darstellt, fehlt. Mit den verwendeten Mengen des Fusionsproteins GST-EBNA2-CR5+6 ist auch in ansteigenden Konzentrationen keine Veränderung des Migrationsverhaltens des CBF1/DNA-Komplexes zu erkennen (Spuren 8-12). Auch die Zugabe des CBF1-spezifischen Antikörpers führt nur zu einer Bande, die vermutlich aus Antikörper, CBF1 und DNA besteht (Spur 12). Das Fusionsprotein GST-EBNA2-CR6 kann unter den verwendeten Konzentrationen an CBF1 binden und ist auch als Fragment biologisch aktiv. Mit den hier verwendeten Konzentrationen des Fusionsproteins GST-EBNA2-CR5+6 konnte keine Bindung an CBF1 demonstriert werden. Allerdings wäre es möglich, dass durch eine größere Proteinmenge an GST-EBNA2-CR5+6 die Interaktion mit CBF1 dargestellt werden kann. Mittlerweile ist bekannt, dass der K_d -Wert der Bindung von EBNA2 an CBF1 mit 4,6 μM deutlich geringer ist als der K_d -Wert der Bindung von Notch zu CBF1 mit 72 nM (Johnson et al., 2010). In diesem Experiment wurde allerdings eine bis zu 20-fach geringere Menge von EBNA2 eingesetzt als von Notch.

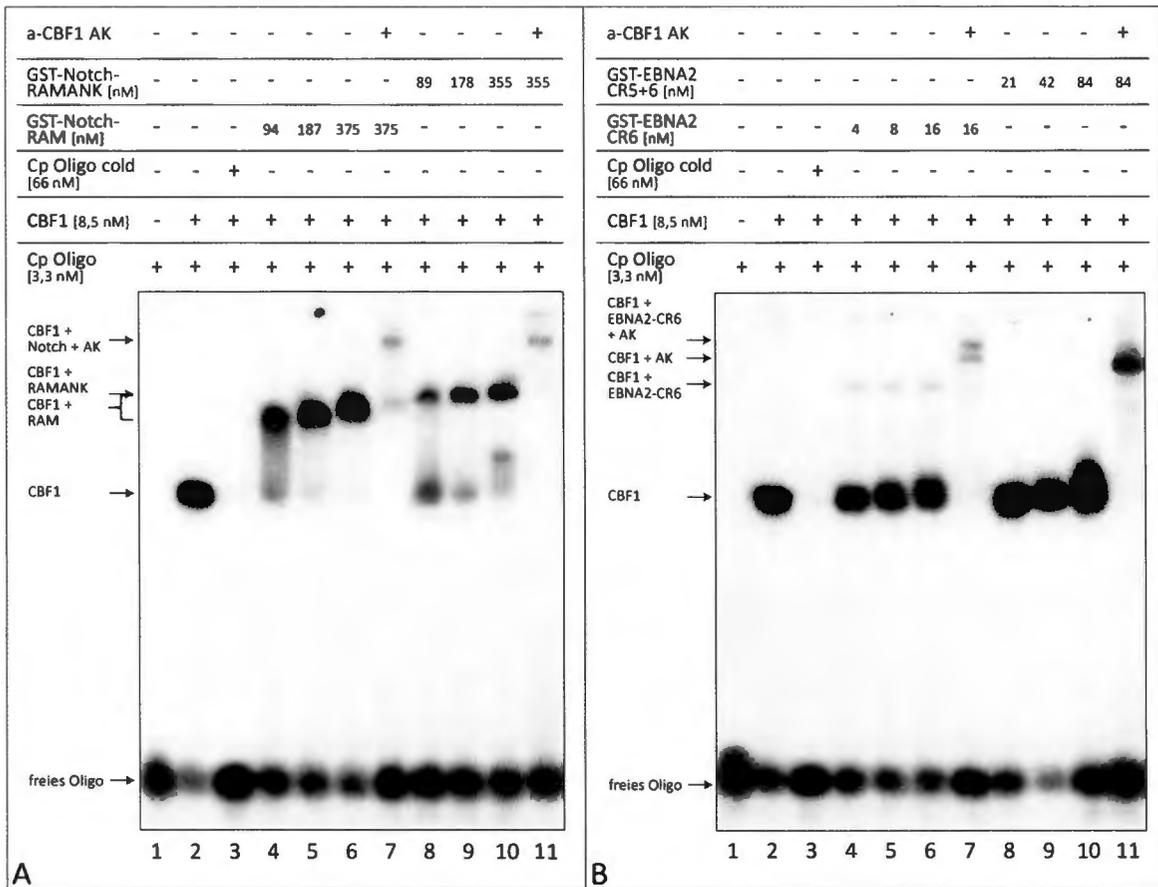


Abbildung 13: Bindung der GST-Fusionsproteine von Notch und EBNA2 an CBF1 in Gel-

Retardationsexperimenten

Für die Gel-Retardationsexperimente wurden die Proteine mit dem CBF1 spezifischen Antikörper RBP-1F1 und dem radioaktiv markierten Cp-Oligo vorinkubiert und in einem nativen, 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. (A) Unterschiedliche Konzentrationen beider Notch-Fusionsproteine binden an den CBF1/DNA-Komplex und verlangsamen dessen Migrationsverhalten. Durch Zugabe des CBF1-spezifischen Antikörpers RBP-1F1 wird die Migration weiterhin verzögert. (B) Das GST-EBNA2-CR6-Fusionsprotein bindet an den CBF1/DNA-Komplex. Die eingesetzte Proteinmenge führt aber nur zur Bindung von einem Teil der CBF1/DNA-Komplexe, so dass neben der Bande die durch das freie Oligo repräsentiert ist, zwei zusätzliche Banden entstehen. Durch Zugabe des CBF1-spezifischen Antikörpers werden diese zwei Banden in ihrem Migrationsverhalten verlangsamt. Das Fusionsprotein GST-EBNA-CR5+6 hat in den verwendeten Konzentrationen keinen erkennbaren Einfluss auf den CBF1/DNA-Komplex.

Das His-CBF1-BTD-Proteinfragment interagiert mit den GST-Fusionsproteinen

Schließlich sollte in einem von der ELISA-Methode unabhängigen Experiment überprüft werden, ob das His-CBF1-BTD-Fragment mit den GST-Fusionsproteinen von Notch und EBNA2 interagieren kann. Um diese biologische Aktivität zu überprüfen, wurde eine Affinitätspräzipitation (AP) mit allen Fusionsproteinen, die rekombinant für den ELISA hergestellt wurden, durchgeführt. Die Vorgehensweise der GST-Affinitätspräzipitation ist in Kapitel 3.4.10.2 (S. 57) beschrieben. 10% des CBF1-Inputs sowie 25% der Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot (WB) mit einem GST- (GST-6G9) bzw. Histidin- (N-His-2F12) spezifischen Antikörper detektiert. Abbildung 14 A zeigt, dass alle GST-Fusionsproteine sowie das GST-Protein exprimiert wurden und an die Glutathion Sepharose Beads gebunden waren. Es ist auch zu erkennen, dass das Fusionsprotein GST-EBNA2-CR6 (Spur 4) sich in seiner Größe von dem Protein GST (Spur 7) unterscheidet. Die Notch-Fusionsproteine allerdings waren teilweise degradiert, so dass nur ein geringer Anteil der vorhandenen Proteine das erwartete Molekulargewicht von 42 kDa bzw. 65,4 kDa der Notch-Fusionsproteine aufwies (Spuren 5 und 6). In Abbildung 14 B ist der Westernblot zur Affinitätspräzipitation (AP) von His-CBF1-BTD dargestellt. Nur die Proteine GST-EBNA2-CR6 (Spur 4) sowie GST-Notch-RAM (Spur 5) und GST-Notch-RAMANK (Spur 6) waren in der Lage das Protein His-CBF1-BTD zu binden. Das Protein GST-EBNA2-CR5+6 (Spur 3) hat His-CBF1-BTD nicht gebunden, obwohl die Proteinmenge mit der von GST-EBNA2-CR6 (Spur 4) vergleichbar war. Die Glutathion Sepharose Beads alleine (Spur 2) und auch das GST-Protein (Spur 7) haben kein His-CBF1-BTD Protein gebunden, so dass die zuvor beschriebenen Signale auf eine spezifische Interaktion von CBF1 und Notch oder CBF1 und EBNA2 zurückzuführen sind.

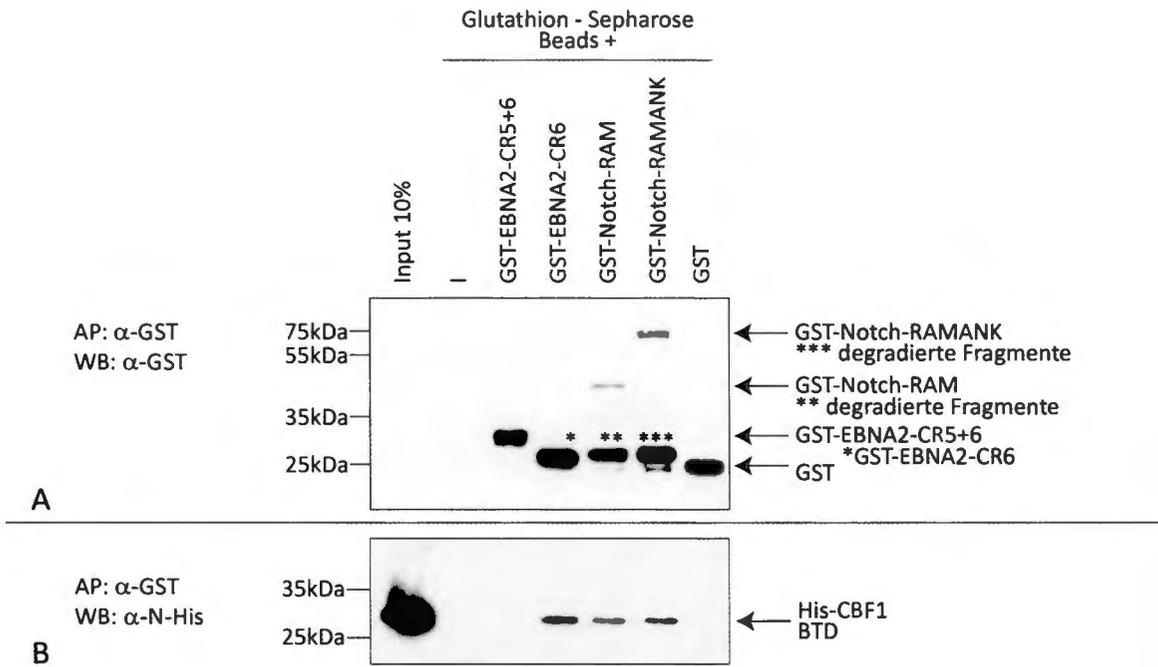


Abbildung 14: Das His-CBF1-BTD-Fragment bindet Fusionsproteine von Notch und EBNA2, aber nicht das GST-Protein oder Glutathion Sepharose Beads

GST-Fusionsproteine und das GST-Protein wurden exprimiert und an Glutathion Sepharose Beads gekoppelt. Mit den gekoppelten Beads und als Kontrolle mit ungekoppelten Beads wurde das His-CBF1-BTD-Fusionsproteins präzipitiert (AP: Affinitätspräzipitation). 10% des CBF1-Inputs sowie 25% der Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot (WB) und dem GST- (GST-6G9) bzw. Histidin- (N-His-2F12) spezifischen Antikörper detektiert. **(A)** Alle Proteine waren exprimiert und an die Beads gekoppelt. Allerdings waren die Notch-Fusionsproteine degradiert (Spuren 5 und 6). Hier ist auch zu erkennen, dass sich das Protein GST-EBNA2-CR6 (Spur 4) in seinem Molekulargewicht von GST (Spur 7) unterscheidet. **(B)** Nur die Fusionsproteine GST-EBNA2-CR6 (Spur 4), GST-Notch-RAM (Spur 5) und GST-Notch-RAMANK (Spur 6) waren in der Lage, das His-CBF1-BTD-Protein zu binden. An Glutathion Sepharose (Spur 2) oder GST (Spur 7) bindet His-CBF1-BTD nicht.

Die Bindung von His-CBF1-BTD an GST-EBNA2-CR6 erscheint in dieser Affinitätspräzipitation genauso stark zu sein wie die Bindung an die Notch-Fusionsproteine. Dies scheint im Widerspruch zu den zuvor beschriebenen Gel-Retardationsanalysen zu stehen, da in diesen Experimenten die Bindung der Notch-Fusionsproteine deutlich stärker war als die Bindung der EBNA2-Fusionsproteine. Allerdings war die Menge der Notch-Fusionsproteine in der Affinitätspräzipitation deutlich geringer als die Menge der EBNA2-Proteine. Es ist anzunehmen,

dass eine größere Menge an EBNA2-Fusionsproteinen auch mehr His-CBF1-BTD binden kann und so der Unterschied in der gebundenen Menge Protein entsteht. Dieses Experiment ermöglicht, wie auch die vorhergehenden Tests, nur eine qualitative Aussage zur biologischen Aktivität der exprimierten Proteinfragmente. Welche Bindungsaffinitäten die Protein/Protein-Interaktionen haben, konnte mit diesen Experimenten jedoch nicht bestimmt werden.

Für die folgende Etablierung des ELISA-basierten HTS zur Identifizierung von Inhibitoren der CBF1/Notch-Interaktion wurde nur das GST-Notch-RAMANK-Fragment verwendet. Beide Notch-Fusionsproteine waren sowohl in den Gel-Retardationsexperimenten (Abbildung 13) als auch in der Affinitätspräzipitation (Abbildung 14) biologisch aktiv. Allerdings war GST-Notch-RAMANK während der Expression und Aufreinigung stabiler als das GST-Notch-RAM-Fragment (s. Abbildung 11 A und B).

Das ELISA-basierte Testsystem für die Identifizierung von Inhibitoren der CBF1/EBNA2-Interaktion sollte mit dem GST-EBNA2-CR6-Fragment etabliert werden, da dieses sowohl in den Gel-Retardationsexperimenten (Abbildung 13) als auch in der Affinitätspräzipitation (Abbildung 14) an CBF1 und das His-CBF1-BTD-Fragment binden konnte.

4.2 Etablierung des ELISA-basierten Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion

Damit ein Testsystem für die Identifizierung von Inhibitoren im Hochdurchsatz verwendet werden kann, muss es gewisse Anforderungen erfüllen. Erstens sollte ein „small molecule screen“ im Hochdurchsatzverfahren (HTS) in kleinen Volumina durchzuführen sein, da so Kosten für Reagenzien gespart werden können. Die Methode des „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) ermöglicht es, Reaktionen in Platten im 96-, 384- und sogar 1536-Loch-Format durchzuführen. In jedem Loch kann die Wirkung eines „small molecules“ überprüft werden, so dass viele Moleküle in kurzer Zeit und unter Verwendung von geringen Mengen der Reagenzien getestet werden können. Zweitens sollten die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass die Interaktion der Proteine zu einem spezifischen Signal führt, welches sich vom Hintergrund deutlich unterscheidet. Deshalb sollten zunächst die notwendigen Konzentrationen der Interaktionspartner ermittelt werden, die zu diesem spezifischen Signal führen (Kapitel 4.2.1, S. 77). Schwankungen in der Reaktionszeit oder auch der Temperatur, die durch die Automatisierung entstehen können, dürfen das Signal/Hintergrund-Verhältnis nicht

beeinträchtigen. Ob sich die gewählten Reaktionsbedingungen für einen HTS eignen, sollte durch die Bestimmung des Signal-Windows und des Z'-Faktors ermittelt werden (Kapitel 4.2.2, S. 83). Drittens ist zu bedenken, dass die meisten „small molecule“-Banken in Lösungsmitteln wie z.B. DMSO vorhanden sind. Daher muss sichergestellt werden, dass diese Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Signalintensität haben (Kapitel 4.2.3, S. 90). Schließlich sollte auch gewährleistet sein, dass die Protein/Protein-Interaktion reversibel ist, um diese Interaktion und das resultierende Signal unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu hemmen (Kapitel 4.2.4, S. 91).

4.2.1 Welche Konzentrationen der Interaktionspartner sind für ein stabiles Signal notwendig?

Beschichtung von ELISA-Platten mit His-CBF1-BTD

Um ein möglichst stabiles Signal in den ELISA-Experimenten zu erhalten, wurden die Proteinmengen der verwendeten Interaktionspartner mehrfach titriert. Zunächst sollte bestimmt werden, mit welcher Konzentration des His-CBF1-BTD-Fragments 96-Loch-ELISA-Platten inkubiert werden müssen, um diese mit Protein zu sättigen und somit möglichst viel Bindestellen für Interaktionspartner zur Verfügung zu stellen. Dafür wurde das His-CBF1-BTD-Fragment in die Endkonzentrationen von 5 μ M bis 20 fM im Schachbrettmuster verdünnt. In Abbildung 15 A ist das Verdünnungsmuster dargestellt. Zunächst wurde die Spalte 1 in 1:2 Schritten (rote Pfeile) verdünnt. Anschließend wurde jede Spalte nochmals 1:2 verdünnt (blaue Pfeile). 100 μ l der Verdünnungen, die einer Proteinmenge von 2 pmol bis 500 pmol entsprechen, wurden auf eine 96-Loch-ELISA-Platte transferiert und diese \ddot{U} N bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das überschüssige Protein durch 3-faches Waschen entfernt und mit dem Histidin-spezifischen Antikörper N-His-2F12 und dem sekundären, Maus-spezifischen Antikörper unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. In Abbildung 15 B sind die Mittelwerte von bis zu acht Einzelwerten der Absorption gegen die Proteinkonzentration in einer logarithmisch skalierten Achse aufgetragen. Die Werte für den Konzentrationsbereich, in dem das Signal exponentiell ansteigt, bestehen aus acht Einzelwerten. Die höchste und die geringste Konzentration werden von Einzelwerten repräsentiert.

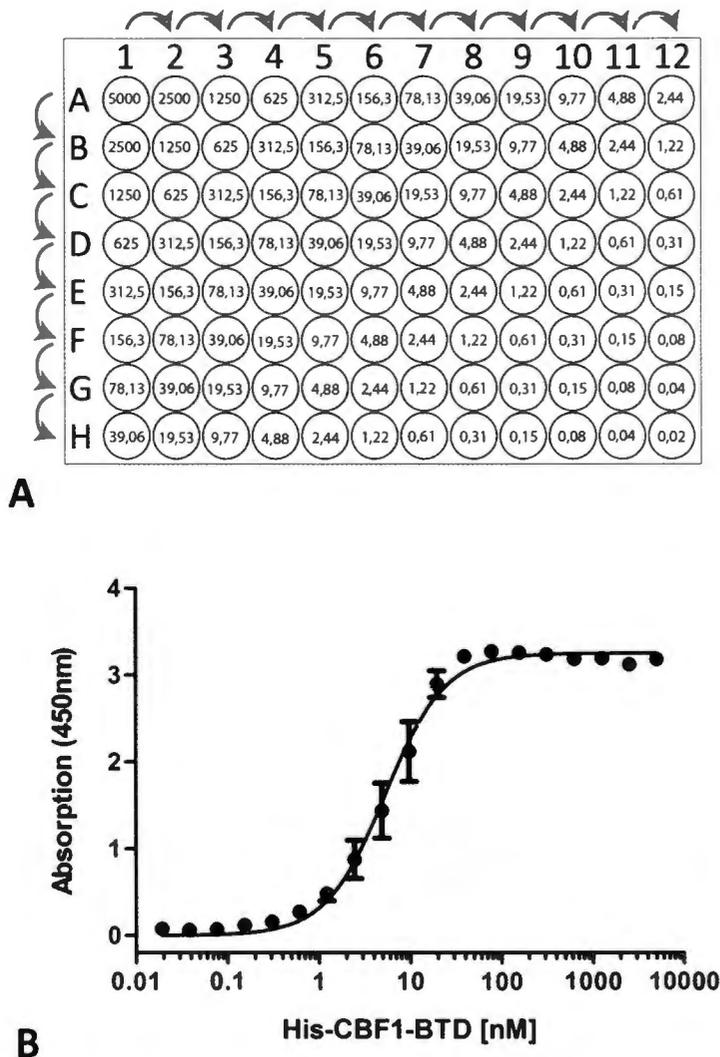


Abbildung 15: Ermittlung der optimalen Konzentration von His-CBF1-BTD zur Beschichtung der ELISA-Platten

Das Proteinfragment His-CBF1-BTD wurde, wie in **(A)** dargestellt, zunächst in Spalte 1 in 1:2 Schritten (rote Pfeile) und anschließend jede Spalten ebenfalls in 1:2 Schritten (blaue Pfeile) in Puffer in Endkonzentrationen von 20 fM bis 5 μ M verdünnt. Eine 96-Loch-Platte wurde mit 100 μ l des His-CBF1-BTD-Fragments ÜN bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Bindung des Proteins mit dem Histidin-spezifischen Antikörper N-His-2F12 (Maus) und dem HRP-gekoppelten, Maus-spezifischen sekundären Antikörper unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. **(B)** Die Werte der Absorption von bis zu acht Einzelwerten sind als Mittelwert mit Standardabweichung gegen jede Konzentration in einer logarithmischen Skalierung aufgetragen. Ab einer Konzentration von 40 nM kommt es zu keinem weiteren Anstieg des Absorptionssignals.

Ab einer His-CBF1-BTD-Konzentration von 40 nM steigt das Absorptionssignal nicht mehr an. Dies entspricht einer Proteinmenge von 4 pmol. Es ist jedoch nicht bekannt, welche

Proteinmenge tatsächlich an die Platte gebunden hat und dadurch für die Interaktion mit dem Notch- oder EBNA2-Fragment zur Verfügung steht. Die 96-Loch-Platten wurden im Folgenden mit 100 μ l des His-CBF1-BTD-Proteins in einer Konzentration von 100 nM inkubiert, um sicher zu gehen, dass die Platten mit Protein gesättigt sind und dadurch möglichst viele Bindestellen für die Interaktionspartner präsentiert werden.

Bestimmung der notwendigen Konzentrationen der CBF1-Interaktionspartner

Der nächste Schritt war es, diejenigen Konzentrationen der Interaktionspartner zu bestimmen, die zu einem deutlich messbaren, CBF1-abhängigen Signal führen. Um die Absorptionswerte der Signale besser vergleichen zu können, wurden die maximalen Absorptionswerte, die durch die CBF1-abhängige Bindung von Notch oder EBNA2 entstehen und den gleichen Wert haben, 100% gleichgesetzt.

Zunächst wurde untersucht, ob das GST-Protein alleine auf CBF1-beschichteten oder unbeschichteten Platten bereits ein Signal erzeugt. Dafür wurde das GST-Protein in einem Endkonzentrationsbereich von 3,2 nM bis 3,2 μ M eingesetzt. Die Detektion der Interaktion erfolgte nun mit dem GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und dem sekundären Ratten-spezifischen Antikörper. In Abbildung 16 A sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier gemessenen Einzelwerten der Absorption gegen die Konzentration des GST-Proteins in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Ab einer GST-Konzentration von 400nM, änderte sich das Absorptionssignal um mindestens 5% im Vergleich zu den maximalen Signalen von der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion, wenn die Platte zuvor mit His-CBF1-BTD inkubiert wurde (schwarze Punkte). Ohne vorhergehende Beschichtung der ELISA-Platte mit His-CBF1-BTD (leere Punkte), lag die Änderung des Absorptionssignals auch bei der höchsten verwendeten Konzentration von 3,2 μ M Protein unter 5% des maximalen Signals, das durch die CBF1/Notch- und CBF1/EBNA2-Interaktion entstand.

Schließlich wurde die Bindung der GST-Fusionsproteine von Notch und EBNA2 an eine Platte ohne CBF1-Beschichtung (leere Punkte) oder an das His-CBF1-BTD-Fragment (schwarze Punkte) untersucht. In Abbildung 16 B sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Einzelwerten für das Signal, das durch die Bindung von GST-Notch-RAMANK in den Endkonzentrationen von 31 fM bis 32 nM entstand, dargestellt. Ab einer Konzentration von 16nM verursachte die CBF1-unabhängige Bindung des GST-Notch-RAMANK-Proteins an die Platte ein Signal von 5% des Maximalwertes (leere Punkte). Wurde die 96-Loch-Platte mit CBF1 beschichtet (schwarze Punkte) erhielt man das Signal, welches auf der CBF1/Notch-Interaktion beruht. Dieses Signal lag bereits bei einer Konzentration von 0,2 nM bei 5% des maximalen

Signals. Ab einer Proteinendkonzentration von 16 nM erhielt man das maximale Signal. Vergleicht man das Signal der spezifischen Interaktion von CBF1 und Notch (schwarze Punkte) mit dem Hintergrundsignal (leere Punkte), das ohne CBF1 entsteht, ist zu erkennen, dass ab der Proteinendkonzentration von 16 nM des Fusionsproteins GST-Notch-RAMANK einerseits das maximale Signal erreicht wird und andererseits das Hintergrundsignal ansteigt. Wird eine Proteinendkonzentration von mehr als 16 nM verwendet, so findet eine Signaländerung vermutlich nur noch aufgrund von unspezifischer Bindung von GST-Notch-RAMANK an die Platte statt.

Neben der Bestimmung der Konzentration, die zu maximalen Absorptionswerten führt, wurde auch die effektive Konzentration ermittelt, welche ein Signal von 50% des Maximalwertes verursacht (EC_{50}). Diese Konzentration sollte für den HTS zur Identifizierung inhibitorischer Moleküle der CBF1/Notch-Interaktion verwendet werden, um eine Sättigung der CBF1/Notch-Interaktion zu verhindern. Denn ein Überangebot des GST-gekoppelten Interaktionspartners könnte die Identifizierung eines Inhibitors beeinträchtigen. Um den EC_{50} -Wert für die Bindung von GST-Notch-RAMANK an His-CBF1-BTD zu ermitteln, wurde die Titration des GST-Fusionsproteins dreimal durchgeführt und der EC_{50} -Wert mit dem Programm GraphPad Prism 5 bestimmt. In Tabelle 18 sind die Einzelwerte des EC_{50} -Wertes von jeder Titration und der daraus resultierende Mittelwert mit Standardabweichung aufgelistet.

Experiment Nr.	EC_{50} [nM]
1	1,6
2	2,0
3	1,9
Mittelwert \pm Standardabweichung	1,8 \pm 0,22

Tabelle 18: Bestimmung des EC_{50} -Wertes von GST-Notch-RAMANK für die Bindung an His-CBF1-BTD

Ca. 1,8 nM GST-Notch-RAMANK sind notwendig, um ein halbmaximales Absorptionssignal zu erhalten. Bei dieser Proteinendkonzentration war die Standardabweichung des Signals allerdings relativ groß (vgl. Abbildung 16 B, schwarze Punkte). Deshalb wurde beschlossen eine Proteinendkonzentration von 10 nM von GST-Notch-RAMANK zu verwenden. Diese Proteinmenge führte zu einem Signal, das an der Schwelle zum Maximalwert der Absorption liegt und daher die CBF1/Notch-Interaktion nicht vollkommen sättigt. Außerdem lagen bei dieser Proteinkonzentration sowohl das Hintergrundsignal, das durch die unspezifische Bindung von GST-Notch-RAMANK an die Platte (vgl. Abbildung 16 B, leere Punkte) als auch das Hintergrundsignal, das durch die unspezifische Bindung von GST an CBF1 entsteht (vgl. Abbildung 16 A, schwarze Punkte), unter 5% des Maximalwertes. Aufgrund der geringen

Hintergrundsignale kann man davon ausgehen, dass die Konzentration von 10 nM GST-Notch-RAMANK zu einem CBF1-spezifischen Absorptionssignal führt.

Abbildung 16 C stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Einzelwerten für das Signal dar, das durch die Bindung von GST-EBNA2-CR6 entstand. Dieses Fusionsprotein wurde in den Endkonzentrationen von 3,2 nM bis 3,2 μ M eingesetzt. Ohne CBF1-Beschichtung (leere Punkte) änderte sich das Absorptionssignal ab einer Konzentration von 1,6 μ M um mindestens 5% des maximalen Signals. Das Signal, das durch die Bindung auf den mit His-CBF1-BTD beschichteten Platten entstand (schwarze Punkte), erreichte schon bei einer Konzentration von 12,5 nM 5% des maximalen Signals und hat bei einer Proteinendkonzentration von 1,6 μ M den maximalen Wert erreicht. Auch hier zeigt der Vergleich der spezifischen Interaktion mit CBF1 (schwarze Punkte) mit dem Hintergrundsignal (leere Punkte), dass die Proteinendkonzentration von 1,6 μ M, bei der das maximale Signal erreicht wird, der Proteinmenge entspricht, ab der auch das Hintergrundsignal über 5% des maximalen Wertes ansteigt. Auch für die Identifizierung von Inhibitoren der CBF1/EBNA2-Interaktion sollte eine Proteinkonzentration des GST-Fusionsproteins verwendet werden, die zu einem halbmaximalen Absorptionswert führt. Der EC_{50} -Wert wurde in vier unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Einzelwerte sowie der Mittelwert und die Standardabweichung sind in Tabelle 19 abgebildet.

Experiment Nr.	EC_{50} [nM]
1	195,4
2	159,4
3	139,4
4	152,1
Mittelwert \pm Standardabweichung	161,6 \pm 24,0

Tabelle 19: Bestimmung des EC_{50} -Wertes von GST-EBNA2-CR6 für die Bindung an His-CBF1-BTD

Eine Proteinendkonzentration von ca. 160 nM GST-EBNA2-CR6 führte zu einem halbmaximalen Wert der Absorption. Bei dieser Proteinendkonzentration entstand kein Hintergrundsignal durch die Bindung an die Platte ohne CBF1 (vgl. Abbildung 16 C, leere Punkte). Allerdings stieg bei dieser Konzentration das Signal, das durch die unspezifische Bindung von GST an CBF1 entsteht (vgl. Abbildung 16 A, schwarze Punkte), an. Deshalb wurde im Folgenden eine Proteinendkonzentration von 100 nM GST-EBNA2-CR6 verwendet.

Werden die durch Titration ermittelten Proteinkonzentrationen für den HTS verwendet, so ist die Proteinmenge, welche aus einem Liter Bakterienkultur aufgereinigt werden kann, ausreichend für den Test von ca. 40000 Substanzen.

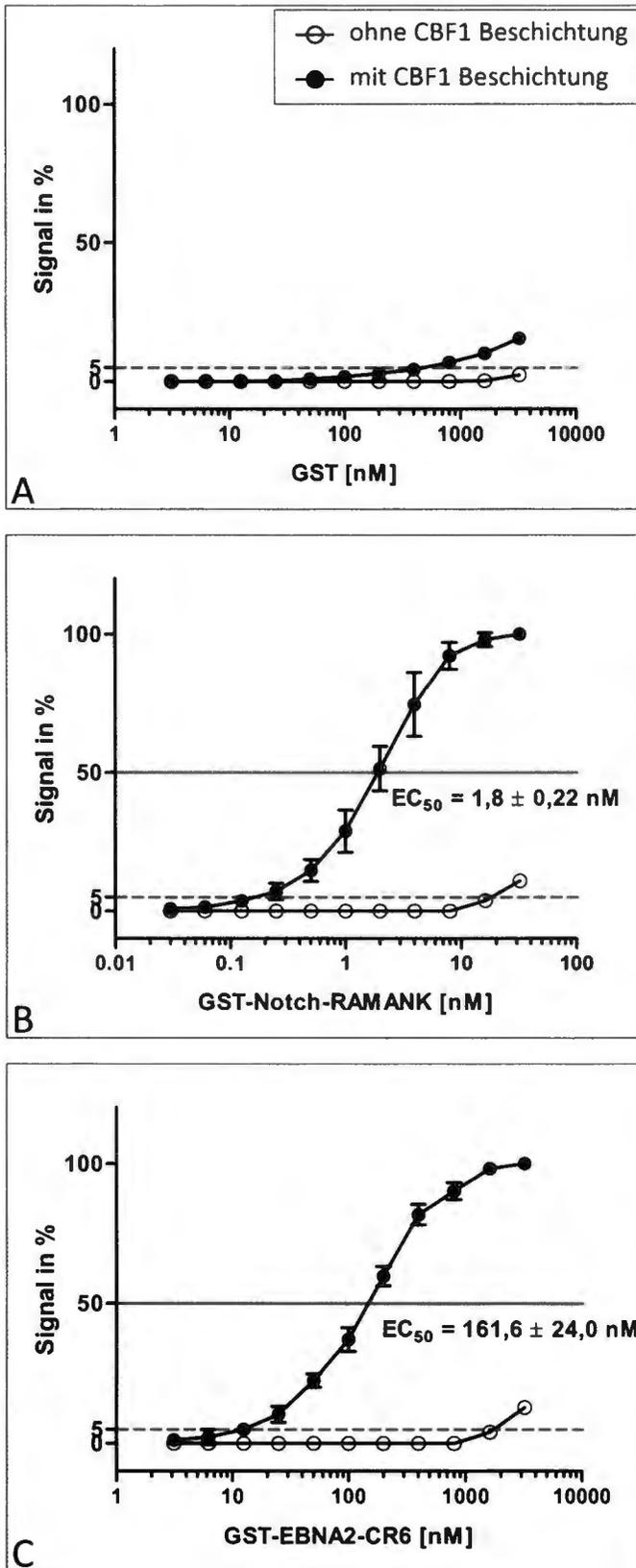


Abbildung 16: Bindung von GST, GST-EBNA2-CR6 und GST-Notch-RAMANK an eine ELISA-Platte mit und ohne His-CBF-BTD-Beschichtung

Die Bindung von GST und den GST-Fusionsproteinen an His-CBF-BTD wurde im ELISA überprüft. 96-Loch-ELISA-Platten wurden mit His-CBF1-BTD oder Puffer beschichtet. GST oder die GST-Fusionsproteine wurden in Endkonzentrationen von 3,1 nM bis 3,2 μ M (GST und GST-EBNA2-CR6) oder 31 fM bis 32 nM (GST-Notch-RAMANK) mit den His-CBF1-BTD beschichteten und unbeschichteten Platten inkubiert. Die Bindung wurde mit dem GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper α -Ratte (Santa Cruz) unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert und die Absorption bei 450 nm gemessen. Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Einzelmessungen als Anteil der Absorptionswerte des maximalen Signals gegen die eingesetzten Proteinkonzentrationen in logarithmischer Skalierung. Schwarze Punkte repräsentieren die Bindung an CBF1 und leere Punkte die CBF1-unabhängige Bindung an die Platte. Die rote unterbrochene Linie markiert, wann das Signal 5% des Maximalwertes erreicht. Die rote durchgehende Linie kennzeichnet das halbmaximale Signal. **(A)** zeigt die Bindung des Proteins GST. Die angegebenen Werte sind Anteile des maximalen Signals, das durch die CBF1-abhängige Bindung von Notch oder EBNA2 entsteht und für beide Proteine den gleichen Wert hat. In **(B)** ist die Bindung von GST-Notch-RAMANK dargestellt. Die Proteinendkonzentration, die zu einem halbmaximalen, CBF1-abhängigen Signal führt (EC_{50} -Wert), wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt und beträgt $1,8 \pm 0,2$ nM. **(C)** zeigt die Bindung von GST-EBNA2-CR6. Die Proteinendkonzentration, die zu einem halbmaximalen, CBF1-abhängigen Signal führt, wurde in vier unabhängigen Experimenten bestimmt und beträgt $161,6 \pm 24,0$ nM.

4.2.2 Kann das ELISA-basierte Testsystem unter den gewählten Reaktionsbedingungen für Hochdurchsatz-Verfahren (HTS) verwendet werden?

Ob sich das ELISA-basierte Testsystem für den Einsatz zur Identifizierung von inhibitorischen „small molecules“ im Hochdurchsatz eignet, wurde durch die Bestimmung des Signal-Windows (Sittampalam et al., 1997) und des Z'-Faktors überprüft. Für beide Werte war es notwendig, die Verteilung des CBF1-abhängigen Absorptionssignals über eine 96-Loch-Platte hinweg zu bestimmen. Die Ermittlung des Signal-Windows erforderte die Messung des halbmaximalen und maximalen Absorptionssignals und des Z'-Faktors die Messung des Hintergrundsignals und des maximalen Signals von jedem Loch einer 96-Loch-Platte. Um das maximale Signal zu erhalten, wurden die in Kapitel 4.2.1 bestimmten Endkonzentration der Proteine GST-Notch-RAMANK (10 nM) und GST-EBNA2-CR6 (100 nM) eingesetzt. Für das halbmaximale Signal wurden Proteinendkonzentrationen von 2 nM für GST-Notch-RAMANK und 20 nM für GST-EBNA2-CR6

verwendet. Das minimale Signal entspricht bei beiden Proteinen dem Hintergrundsignal und entsteht ohne die Zugabe des GST-Fusionsproteins. In Abbildung 17 die notwendigen Messwerte für den CBF1/Notch-ELISA (A) und den CBF1/EBNA2-ELISA (B), welche durch die CBF1-spezifische Interaktion (halbmaximales und maximales Signal) bzw. durch die CBF1-Beschichtung ohne Interaktionspartner (minimales Signal) entstehen, dargestellt. Die Einzelwerte der Absorption jedes Lochs der drei Platten werden durch Punkte gekennzeichnet. Die Mittelwerte (MW) für das minimale, halbmaximale und maximale Signal sind als horizontale Linien abgebildet. Den Toleranzbereich für den Mittelwert erhält man durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung ($\pm 3SD$). Der Toleranzbereich der entsprechenden Mittelwerte wird durch unterbrochene Linien begrenzt.

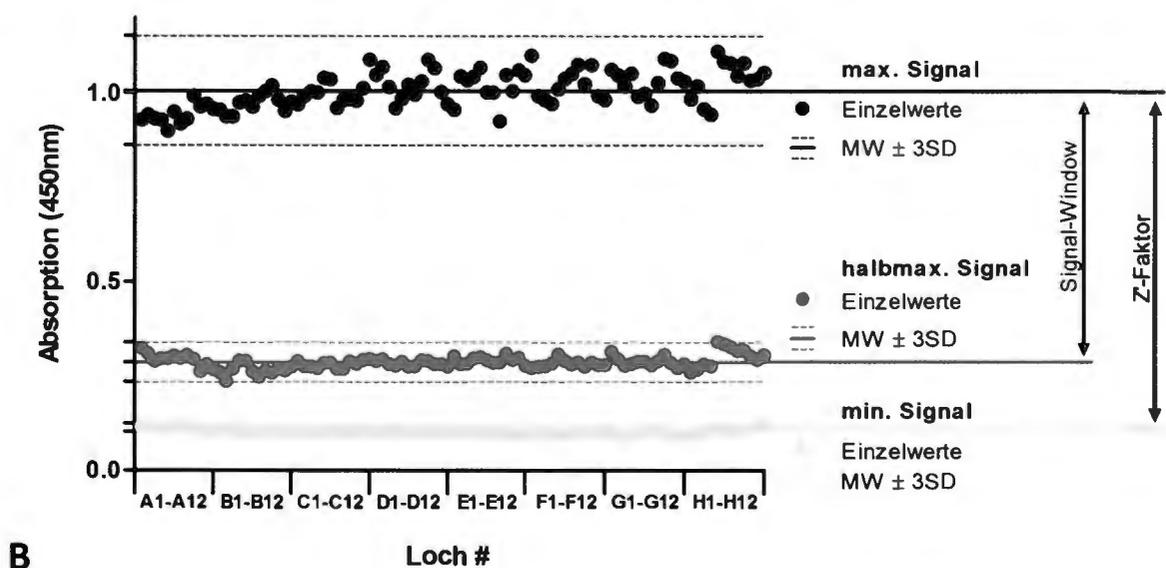
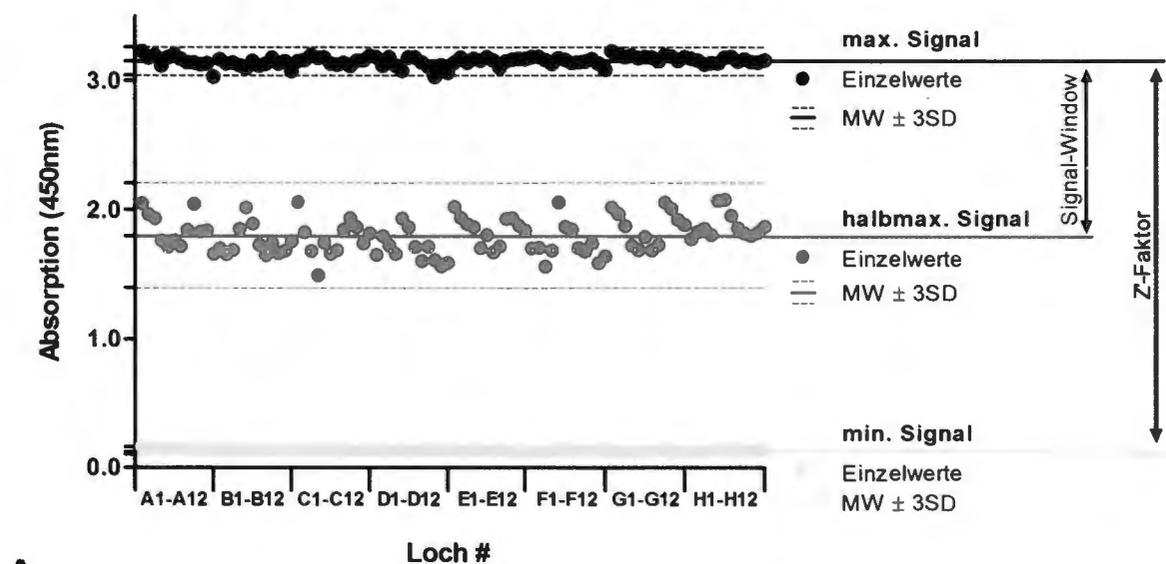


Abbildung 17: Messung der maximalen, halbmaximalen und minimalen Absorptionssignale zur Bestimmung des Signal-Window und des Z'-Faktors

Das Signal-Window und der Z'-Faktor sollten für die ELISA-basierten Testsysteme zur Identifizierung von Inhibitoren der CBF1/Notch- und CBF1/EBNA2-Interaktion berechnet werden. Zu diesem Zweck wurden ELISA-Platten mit CBF1 beschichtet, mit unterschiedlichen Konzentrationen der Interaktionspartner inkubiert und die CBF1-abhängige Bindung sowie das Hintergrundsignal mit dem GST-spezifischen Antikörper (GST-6G9) und dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. Es wurde jeweils das maximale, halbmaximale und minimale Signal gemessen. In **(A)** sind die Werte des CBF1/Notch-ELISA und in **(B)** sind die Werte der CBF1/EBNA2-ELISA dargestellt. Um das maximale Signal zu erhalten, wurden Proteinendkonzentrationen von 10 nM GST-Notch-RAMANK und 100 nM GST-EBNA2-CR6 eingesetzt. Das halbmaximale Signal erforderte Proteinmengen von 2 nM GST-Notch-RAMANK und 20 nM GST-EBNA2-CR6. Das minimale Signal entspricht dem Hintergrundsignal, das durch die Beschichtung mit CBF1 ohne Interaktionspartner entsteht. Die Einzelwerte der drei Platten sind als Punkte dargestellt. Die Mittelwerte (MW) des maximalen, halbmaximalen und minimalen Signals werden durch durchgehende Linien gekennzeichnet. Die Toleranzbereiche der Mittelwerte entstehen durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung ($\pm 3SD$) und werden durch unterbrochene Linien begrenzt. Für die Berechnung des Signal-Window sind die Messungen der maximalen und halbmaximalen Absorption notwendig und die Berechnung des Z'-Faktors erfordert die Messung der maximalen und minimalen Absorption.

Der Wert des Signal-Window hat keine Einheit und wurde mit Formel (1) berechnet (Sittampalam et al., 1997):

(1)

$$SW = \frac{(MW_{max} - 3 \times SD_{max}) - (MW_{halbmax} + 3 \times SD_{halbmax})}{SD_{max}}$$

SW = Signal – Window

MW_{max} = Mittelwert maximales Absorptionssignal

$MW_{halbmax}$ = Mittelwert halbmaximales Absorptionssignal

SD_{max} = Standardabweichung maximales Absorptionssignal

$SD_{halbmax}$ = Standardabweichung halbmaximales Absorptionssignal

Bestimmt man die Mittelwerte MW_{max} und $MW_{halbmax}$ und Standardabweichungen SD_{max} sowie $SD_{halbmax}$ für die maximalen und halbmaximalen Absorptionssignale, so können die Signal-Windows für die ELISA-basierten Testsysteme zur CBF1/Notch- und CBF1/EBNA2-Interaktion berechnet werden.

$$SW_{CBF1/Notch} = \frac{(2,86 - 3 \times 0,04) - (1,29 + 3 \times 0,09)}{0,04}$$

$$SW_{CBF1/Notch} = 29,5$$

$$SW_{CBF1/EBNA2} = \frac{(1,01 - 3 \times 0,05) - (0,29 + 3 \times 0,02)}{0,05}$$

$$SW_{CBF1/EBNA2} = 10,2$$

Das Signal-Window für den CBF1/Notch-ELISA hat einen Wert von 29,5 und für den CBF1/EBNA2-ELISA einen Wert von 10,2. Es ist wichtig, dass der Wert des Signal-Window größer als zwei ist. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit (p), ein tatsächlich inhibitorisch wirkendes Molekül, das als Hit bezeichnet wird, zu identifizieren. Um zu verdeutlichen, wie die Größe des Signal-Windows mit der Wahrscheinlichkeit, einen Hit zu erzielen, korreliert, sollte die Wahrscheinlichkeit p(Hit) mittels der kumulativen Verteilungsfunktion der Normalverteilung (Φ) mit dem Programm Mathematica 8 berechnet werden. Dafür war es zunächst notwendig, zu ermitteln, um welchen Prozentanteil des maximalen Wertes das Absorptionssignal an der Toleranzgrenze verringert ist. Dieser Wert wird hier als h_{inh} bezeichnet und wurde mit Formel (2) berechnet.

(2)

$$h_{inh} = \frac{MW_{max} - (MW_{max} - 3 \times SD_{max})}{MW_{max}} \times 100\%$$

SD_{max} = Standardabweichung maximales Absorptionssignal

MW_{max} = Mittelwert maximales Absorptionssignal

Die Inhibition bei maximalem Signal MW_{max} beträgt erwartungsgemäß null.

(3)

$$\mu_{inh\ 0} = \frac{MW_{max} - MW_{max}}{MW_{max}} \times 100\% = 0$$

Außerdem war es notwendig auch die Standardabweichung SD_{max} in Prozentanteile des maximalen Signals umzurechnen.

(4)

$$\sigma_{inh\ 0} = \frac{SD_{max}}{MW_{max}} \times 100\%$$

Mit diesen Werten war es möglich, zu berechnen, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Molekül die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion tatsächlich hemmt, wenn das Absorptionssignal um mehr als die Inhibition an der Toleranzgrenze h_{inh} verringert wird. Schließlich wurde die Wahrscheinlichkeit $p(\text{Hit})$ mittels der kumulativen Verteilungsfunktion der Normalverteilung (Φ) nach Formel (5) berechnet (Sittampalam et al., 1997).

(5)

$$p(\text{Hit}) = 1 - \Phi\left(\sqrt{n} \frac{h_{inh} - \mu_{inh\ 0}}{\sigma_{inh\ 0}}\right)$$

Φ = kumulative Verteilungsfunktion der Normalverteilung

n = Anzahl der durchgeführten Tests = 1

h_{inh} = Inhibition an der Toleranzgrenze von MW_{max} in %

$\sigma_{inh\ 0}$ = SD_{max} in % des maximalen Absorptionssignals

$\mu_{inh\ 0}$ = Inhibition bei maximalem Signal

Abbildung 18 stellt die Verteilungsfunktion der Wahrscheinlichkeit $p(\text{Hit})$ graphisch dar. Der Kurvenverlauf dieser Wahrscheinlichkeit ist gelb dargestellt. Die Inhibition an der Toleranzgrenze h_{inh} wird durch eine blaue, unterbrochene Linie markiert. Entspricht die Inhibition eines „small molecules“ der Signalminderung an der Toleranzgrenze h_{inh} , so beträgt die Wahrscheinlichkeit $p(\text{Hit}) = 0,5$. Eine rote durchgehende Linie markiert die Abnahme des Signals, welche notwendig ist, um mit $p(\text{Hit}) = 1$ einen Inhibitor zu identifizieren. Abbildung 18A zeigt die Verteilung der Hit-Wahrscheinlichkeit für den ELISA zur CBF1/Notch-Interaktion. Die Inhibition an der Toleranzgrenze h_{inh} entspricht einer Abnahme des Signals um 4,1%. Ab einer Signalminderung von 8,2% ist $p(\text{Hit}) = 1$. Das bedeutet, dass jedes „small molecule“, welches das Absorptionssignal um mindestens 8,2% hemmt, ein potentieller Inhibitor der CBF1/Notch-Interaktion ist. Abbildung 18B stellt die Verteilungsfunktion der Hit-Wahrscheinlichkeit für den CBF1/EBNA2-ELISA dar. In diesem Fall liegt die Inhibition an der Toleranzgrenze h_{inh} bei 14,3%.

Um die Hit-Wahrscheinlichkeit von $p(\text{Hit}) = 1$ zu erhalten, ist es notwendig, das maximale Signal um mindestens 28,6% zu inhibieren.

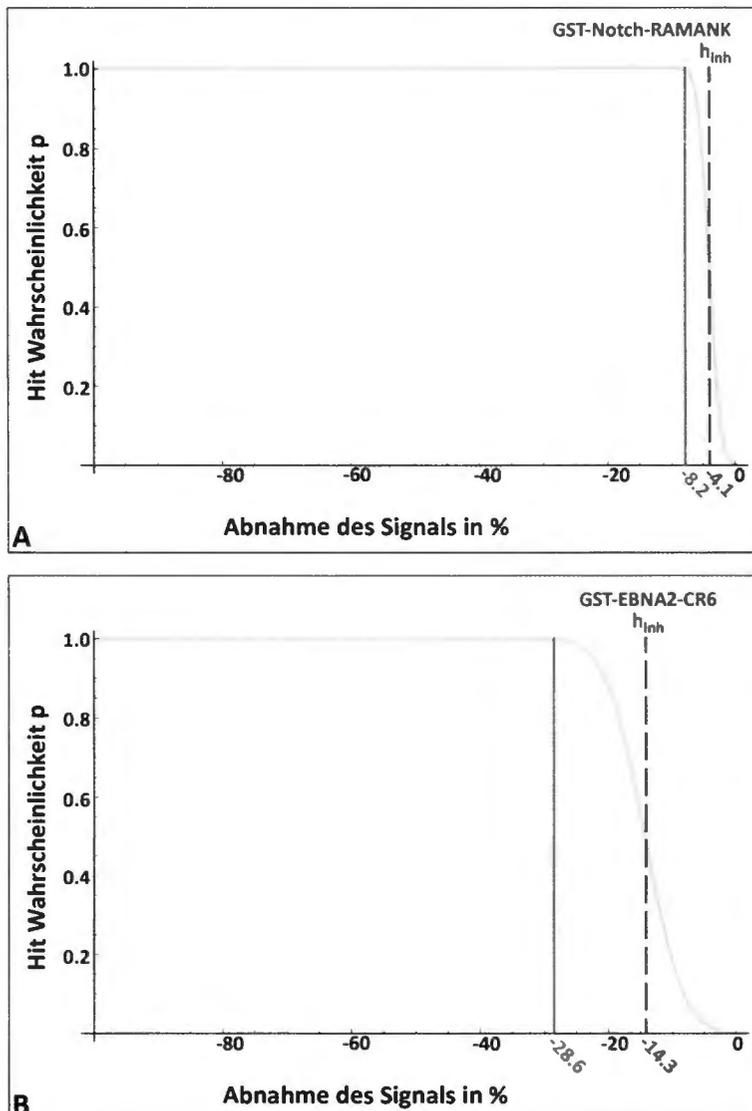


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Hit-Wahrscheinlichkeit in den ELISA-basierten Testsystemen

Sowohl für den CBF1/Notch-ELISA (**A**) als auch den CBF1/EBNA2-ELISA (**B**) wurde die Kurve der Verteilung der Hit-Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Abnahme des Signals graphisch in Gelb dargestellt. Die Toleranzgrenze h_{inh} , bei der die Wahrscheinlichkeit $p(\text{Hit}) = 0,5$ ist, wird durch eine blaue unterbrochene Linie gekennzeichnet. Eine rote durchgehende Linie markiert, ab welcher Signalminderung die Wahrscheinlichkeit $p(\text{Hit}) = 1$ ist. Die Toleranzgrenze des Testsystems zur CBF1/Notch-Interaktion (**A**) ist eine Abnahme des Signals um 4,1%. Wird das Signal um mindestens 8,2% gehemmt, so ist das verantwortliche „small molecule“ ein potentieller Inhibitor der Proteininteraktion. Der ELISA zur CBF1/EBNA2-Interaktion (**B**) hat eine Inhibition von 14,3% an der Toleranzgrenze und erfordert eine Signalminderung von mindestens 28,6%, um $p(\text{Hit})=1$ zu erhalten.

Der ELISA zur CBF1/Notch-Interaktion hat ein Signal-Window von 29,5 und ermöglicht die Identifizierung eines Inhibitors bereits ab einer Abnahme des Signals um 8,2%. Das Signal-Window des ELISA-basierten Testsystems zur CBF1/EBNA2-Interaktion hat dagegen nur einen Wert von 10,2 und erfordert eine Signalmindering von 28,6%, um einen Hemmstoff zu identifizieren. Vergleicht man beide ELISA-basierten Testsysteme, so ist zu erkennen, dass bei einem hohen Wert des Signal-Windows, eine geringere Abnahme des Signals notwendig ist, um einen Hit zu erzielen. Je kleiner das Signal-Window ist, desto stärker muss das Signal durch ein „small molecule“ gehemmt werden, damit es als Inhibitor erkannt wird. Der kleinste Wert, den das Signal-Window eines Testsystems einnehmen darf, damit es für HTS verwendet werden kann, beträgt zwei. Das Signal-Window für beide ELISA-basierten Testsysteme ist deutlich größer als zwei und qualifiziert diese Testsysteme dadurch für den Einsatz als HTS-Verfahren.

Der Z'-Faktor wurde unter Verwendung der in Abbildung 17 dargestellten Messwerte für das maximale Absorptionssignal und das Hintergrundsignal berechnet. Die Formel (6) für den Z'-Faktor findet sich in der Publikation von Zhang (Zhang, J. H. et al., 1999).

(6)

$$Z' = \frac{(MW_{max} - 3 \times SD_{max}) - (MW_{min} + 3 \times SD_{min})}{MW_{max} - MW_{min}}$$

$Z' = Z' - \text{Faktor}$

MW_{max} = Mittelwert maximales Absorptionssignal

MW_{min} = Mittelwert Hintergrundsignal

SD_{max} = Standardabweichung maximales Absorptionssignal

SD_{min} = Standardabweichung Hintergrundsignal

Der Z'-Faktor kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, sollte jedoch einen Wert von mindestens 0,5 haben, damit ein Testsystem für einen HTS verwendet kann (Zhang, J. H. et al., 1999).

$$Z'_{CBF1/Notch} = \frac{(2,86 - 3 \times 0,04) - (0,10 + 3 \times 0,01)}{2,86 - 0,10}$$

$$Z'_{CBF1/Notch} = 0,95$$

$$Z'_{CBF1/EBNA2} = \frac{(1,01 - 3 \times 0,05) - (0,10 + 3 \times 0,01)}{1,01 - 0,10}$$

$$Z'_{CBF1/EBNA2} = 0,8$$

Die ELISA-basierten Testsysteme zur Identifizierung inhibitorischer „small molecules“ haben für die CBF1/Notch-Interaktion einen Z'-Faktor von 0,95 und für die CBF1/EBNA2-Interaktion einen Z'-Faktor von 0,8. Beide Werte sind größer als 0,5. Daher qualifizieren sich beide Testsysteme für den Einsatz in einem HTS.

4.2.3 Hat das Lösungsmittel DMSO einen Einfluss auf die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion?

Die meisten „small molecule“-Banken sind in DMSO als Lösungsmittel aufgenommen. Daher sollte kontrolliert werden, ob das Absorptionssignal, welches durch die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion entsteht, durch DMSO beeinträchtigt wird. Um das zu überprüfen, wurde die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK (10 nM) oder GST-EBNA2-CR6 (100 nM) ohne und in Gegenwart von 1% und 2% DMSO detektiert. Der Nachweis der Proteininteraktion erfolgte durch den GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und den Ratten-spezifischen, HRP-gekoppelten sekundären Antikörper unter Umsetzung von TMB-Substrat. In Abbildung 19 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei Einzelwerten der Absorption in Abhängigkeit von unterschiedlichen DMSO-Anteilen dargestellt.

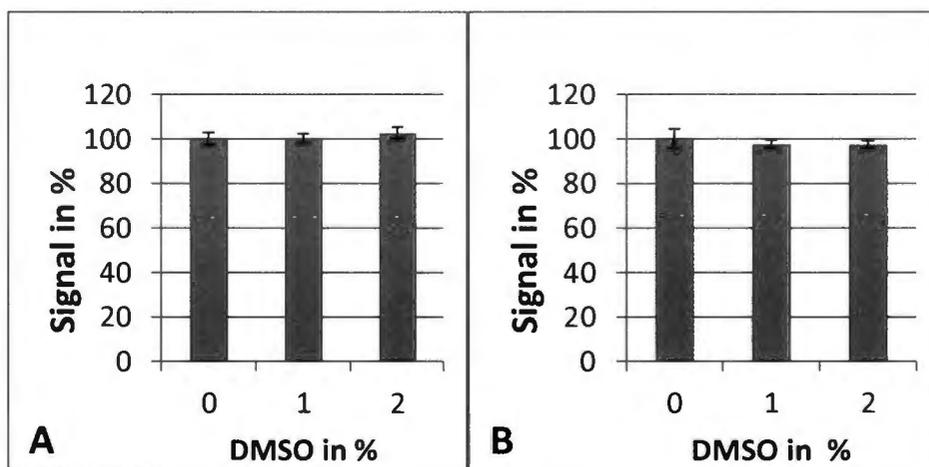


Abbildung 19: Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion im ELISA-basierten Testsystem

Die CBF1-abhängige Bindung von 10 nM GST-Notch-RAMANK (**A**) oder 100 nM GST-EBNA2-CR6 (**B**) wurde ohne oder in Gegenwart von 1% und 2% DMSO mit dem GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und dem HRP-gekoppelten, Ratten-spezifischen sekundären Antikörper unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. Die verwendeten Mengen

DMSO von 1% und 2% des Reaktionsvolumens haben keinen Einfluss auf die CBF1/Notch-**(A)** oder die CBF1/EBNA2-Interaktion **(B)**.

DMSO-Konzentrationen von 1% und 2% des Reaktionsvolumens haben keine Auswirkung auf das Signal, das durch den Nachweis der Bindung von GST-Notch-RAMANK oder GST-EBNA2-CR6 an His-CBF1-BTD entsteht. In einen „small molecule screen“ kann daher diejenige Menge an DMSO-gelösten Molekülen eingesetzt werden, die bis zu 2% des Reaktionsvolumens entspricht, ohne das Absorptionssignal zu beeinträchtigen.

4.2.4 Können die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktionen im ELISA-basierten Testsystem gehemmt werden?

In Kapitel 4.2.1 wurden die Endkonzentrationen der Interaktionspartner bestimmt, die in dem ELISA-basierten Testsystem verwendet werden sollten. Dabei wurde unter anderem auch darauf geachtet, dass die GST-Fusionsproteine nicht im Übermaß vorhanden sind, um eine Inhibition zu ermöglichen. Ob die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK oder GST-EBNA2-CR6 reversibel ist, sollte im Folgenden durch die Zugabe eines kompetitiven Peptids überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die GST-Fusionsproteine in den zuvor definierten Konzentrationen für HTS von 10 nM GST-Notch-RAMANK oder 100 nM GST-EBNA2-CR6 mit Peptid (wt oder mt) in einem Konzentrationsbereich von 0,2 μ M bis 6,25 μ M gemischt. Die Mischung wurde auf mit His-CBF1-BTD beschichtete Platten transferiert und die CBF1-abhängige Bindung der GST-Fusionsproteine mit dem GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und dem HRP-gekoppelten, Ratten-spezifischen sekundären Antikörper unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. Als Peptid wurden die von dem Protein vIRF4 abgeleiteten Fragmente verwendet, die bereits für die Affinitätspräzipitation von His-CBF1-BTD in Kapitel 4.1.2 (Abbildung 12 A, S. 75) verwendet wurden. Das wt-Peptid beinhaltet das WxP-Motiv und in dem mt-Peptid wurden die für die Bindung essentiellen Aminosäuren Tryptophan (W) und Prolin (P) durch Alanin (A) substituiert. Als Referenz wurde außerdem das maximale Absorptionssignal gemessen, das entsteht, wenn kein Peptid zu der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion hinzugefügt wurde und das minimale Absorptionssignal, das durch CBF1 mit den Peptiden, aber ohne GST-Fusionsprotein als Interaktionspartner verursacht wird. In Abbildung 20 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Einzelwerten für die unterschiedlichen Kombinationen der Interaktionspartner dargestellt. Die Zugabe des wt-Peptids führte sowohl bei der CBF1/Notch- als auch bei der CBF1/EBNA2-Interaktion zu einer deutlichen Reduktion des

Signals. Durch das mt-Peptid, das kein WxP-Motiv mehr beinhaltet, wurde das maximale Absorptionssignal nicht verändert. Dies bedeutet, dass die Inhibition der CBF1/Notch- und CBF1/EBNA2-Interaktion durch ein Peptid mit WxP-Motiv spezifisch ist.

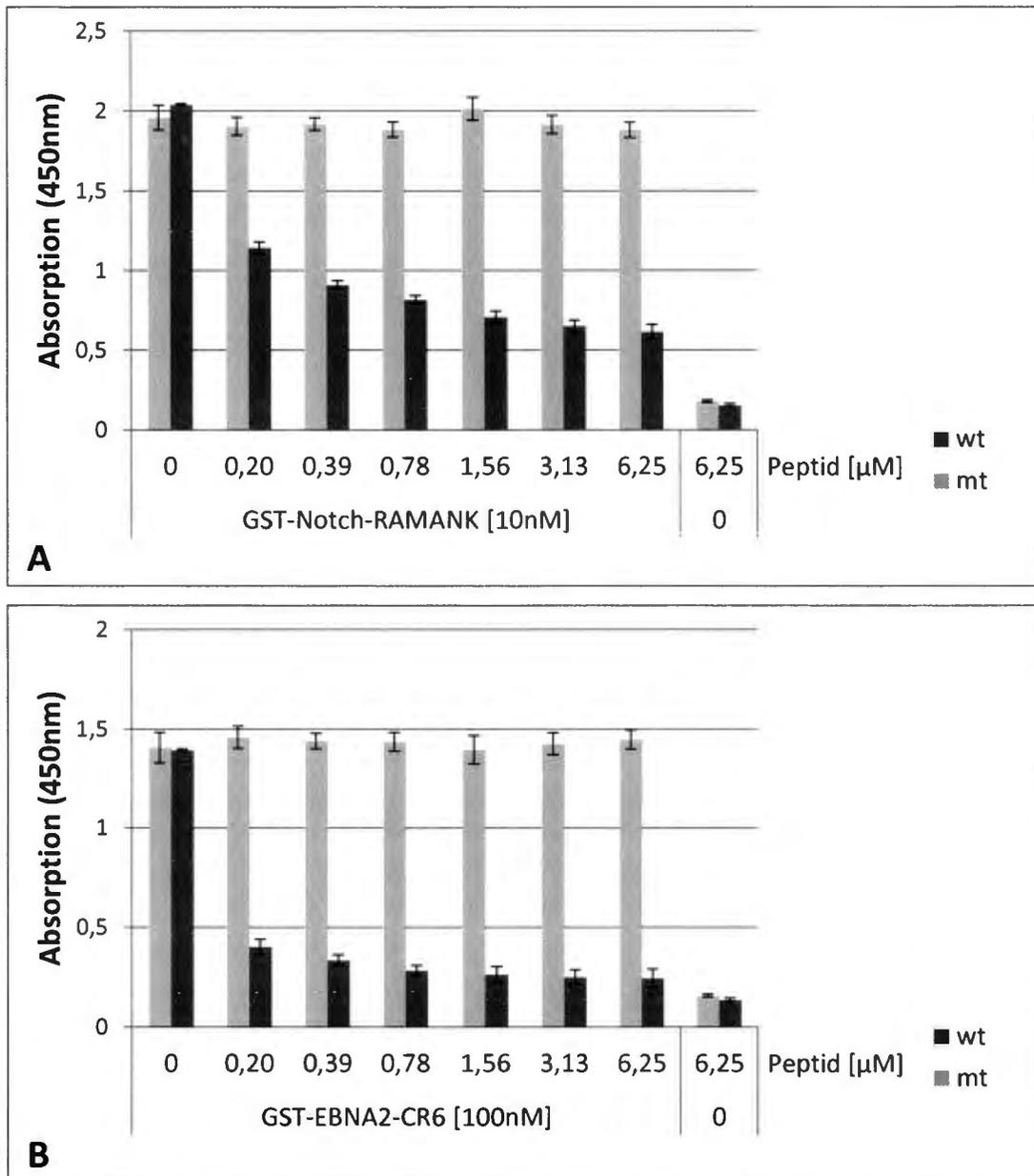


Abbildung 20: Inhibition der Interaktion von His-CBF1-BTD mit den GST-Fusionsproteinen durch ein *v1RF4*-Peptid, welches das WxP-Motiv enthält

96-Loch-ELISA-Platten wurden mit His-CBF1-BTD beschichtet. Die GST-Fusionsproteine wurden in Konzentrationen von 10 nM GST-Notch RAMANK oder 100 nM GST-EBNA2-CR6 mit Peptid wt oder mt in Konzentrationen von 0,2 μ M bis 6,25 μ M gemischt. Die Mischungen wurden auf die mit His-CBF1-BTD beschichteten Platten transferiert und die Bindung der GST-Fusionsproteine wurde mit dem GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und dem HRP-gekoppelten, Ratten-spezifischen sekundären Antikörper (Santa Cruz)

unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Einzelwerten sind dargestellt. Sowohl die Interaktion von GST-Notch-RAMANK mit His-CBF1-BTD (**A**) als auch die Interaktion von GST-EBNA2-CR6 mit His-CBF1-BTD (**B**) konnte nur mit dem wt-Peptid, welches das WxP-Motiv enthält, inhibiert werden. Das mt-Peptid, dessen WxP-Motiv durch Alanine substituiert wurde, hatte keinen Einfluss auf die CBF1-abhängige Bindung der GST-Fusionsproteine.

4.2.5 Kann das ELISA-basierte Testsystem auf das 384-Loch-Format reduziert werden?

Schließlich sollte überprüft werden, ob es möglich ist, das Reaktionsvolumen von 100 μ l auf 25 μ l zu reduzieren und das ELISA-basierte Testsystem im 384-Loch-Format durchzuführen. Für jede Bindereaktion wurden die Proteinmengen auf ein Viertel der zuvor verwendeten Menge reduziert. GST-Notch-RAMANK wurde in einer Endkonzentration von 10 nM mit dem wt-Peptid, d.h. mit WxP-Motiv oder mt-Peptid, mit mutiertem WxP-Motiv, in einer Endkonzentration von 25 μ M gemischt, auf CBF1 beschichtete 384-Loch-Platten transferiert und die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK wurde mit dem GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und dem HRP-gekoppelten, Ratten-spezifischen sekundären Antikörper unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. Als Referenz wurde außerdem das maximale Absorptionssignal gemessen, das entsteht, wenn kein Peptid zu der CBF1/Notch-Interaktion hinzugefügt wurde und das minimale Absorptionssignal, das durch die CBF1-Beschichtung alleine oder CBF1 mit den Peptiden, aber ohne GST-Fusionsprotein als Interaktionspartner, verursacht wird. In Abbildung 21 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von acht Einzelwerten für die unterschiedlichen Kombinationen der Interaktionspartner dargestellt. Die CBF1/Notch-Interaktion führte auch nach der Verringerung des Reaktionsvolumens zu einem deutlich messbaren Signal. Die Zugabe des wt-Peptids führte bei der CBF1/Notch-Interaktion zur Reduktion des Absorptionssignals. Allerdings ist der Effekt hier nicht so groß, wie zuvor in den Platten im 96-Loch-Format (vgl. Abbildung 20 A). Durch das mt Peptid, das kein WxP-Motiv mehr beinhaltet, wurde das maximale Absorptionssignal nicht verändert. Weder die Beschichtung mit His-CBF1-BTD noch GST-Notch-RAMANK oder die Peptide (wt und mt) alleine verursachten ein starkes Signal. Diese Werte entsprechen dem Hintergrundsignal, das durch die Absorption der Platte entsteht.

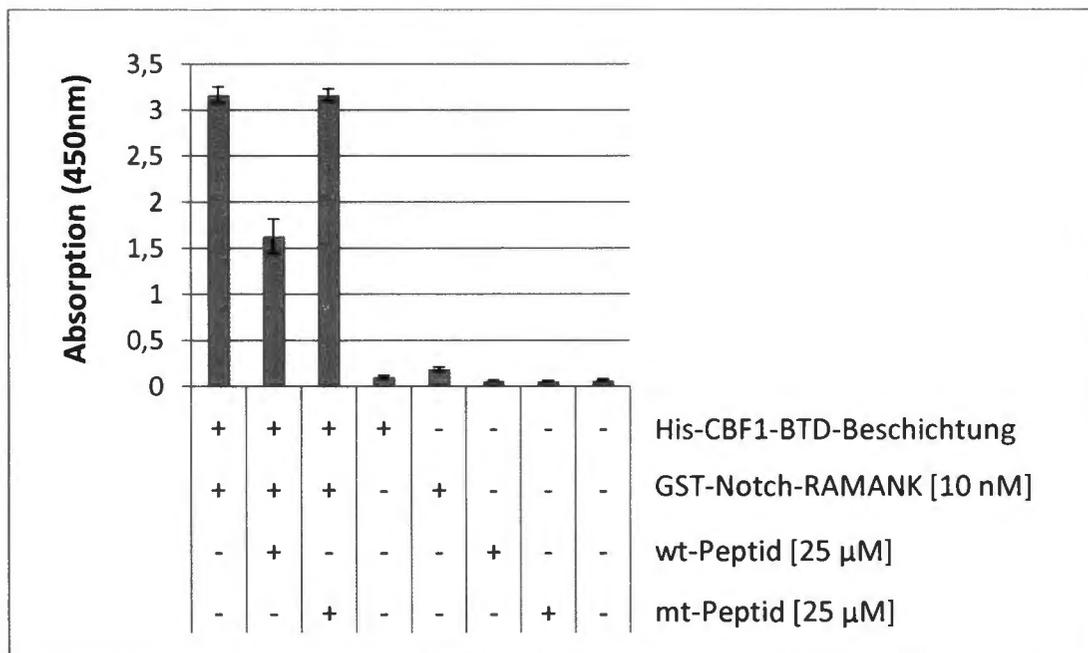


Abbildung 21: Signale der CBF1/Notch-Interaktion im ELISA-basierten Testsystem im 384-Loch-Format

Für die Verwendung des 384-Loch-Formats wurden das Reaktionsvolumen und die eingesetzten Proteine auf ein Viertel der ursprünglich verwendeten Mengen reduziert. Eine 384-Loch-ELISA Platte wurde mit His-CBF1-BTD beschichtet. Das Fusionsprotein GST-Notch-RAMANK wurde in einer Endkonzentration von 10 nM mit den Peptiden (wt oder mt) einer Endkonzentration von 25 µM gemischt. Die Mischung wurde auf die mit His-CBF1-BTD beschichtete Platte transferiert. Die Bindung wurde mit dem GST-spezifischen Antikörper GST-6G9 (Ratte) und dem HRP-gekoppelten, Ratten-spezifischen sekundären Antikörper (Santa Cruz) unter Umsetzung von TMB-Substrat detektiert. Durch die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK entsteht ein deutlich messbares Signal, das durch Zugabe von wt-Peptid aber nicht mt-Peptid inhibiert werden kann. Die Beschichtung mit His-CBF1-BTD, GST-Notch-RAMANK oder die Peptide (wt oder mt) alleine zeigen nur ein geringes Signal, das dem Hintergrundsignal, welches durch die Platte selbst entsteht, entspricht.

4.3 Inhibition der CBF1/Notch-Interaktion im ELISA-basierten Testsystem

Mit dem ELISA-basierten Testsystem zur Identifizierung von Inhibitoren der CBF1/Notch-Interaktion wurden die Effekte von Molekülen aus drei kleinen „small molecule“-Banken auf die Bindung von GST-Notch-RAMANK an His-CBF1-BTD überprüft. Die erste Bank wurde von der „Screening Facility“ des Helmholtz Zentrums München zusammengestellt und besteht aus 800 „small molecules“ der Firma AnalytiCon Discovery GmbH. Sie enthält Moleküle, die sowohl

synthetischen als auch natürlichen Ursprungs sind. Die zweite Bank wird von der Firma Specs in Form einer bereits bestehenden Naturstoffbank verkauft. Diese Bank besteht aus 400 „small molecules“ aus natürlichen Quellen, wie Pflanzen, Pilzen, Bakterien oder Meeresorganismen. Die „small molecules“ dieser Bank wurden entweder direkt aus ihren natürlichen Quellen isoliert oder auf Grundlage der Isolate halbsynthetisch oder synthetisch hergestellt. Die dritte Bank schließlich wurde vom Helmholtz Zentrum in Braunschweig zusammengestellt und wird im Folgenden als NHC Naturstoffbank bezeichnet. Sie besteht aus 160 Naturstoffen, die mykobakteriellen Ursprungs sind. Insgesamt wurde die Wirkung von 1360 „small molecules“ (s. Tabelle 20) auf die CBF1/Notch-Interaktion im ELISA-basierten Testsystem überprüft. Die durchgeführten Screens werden im Folgenden am Beispiel der NHC Naturstoffbank veranschaulicht.

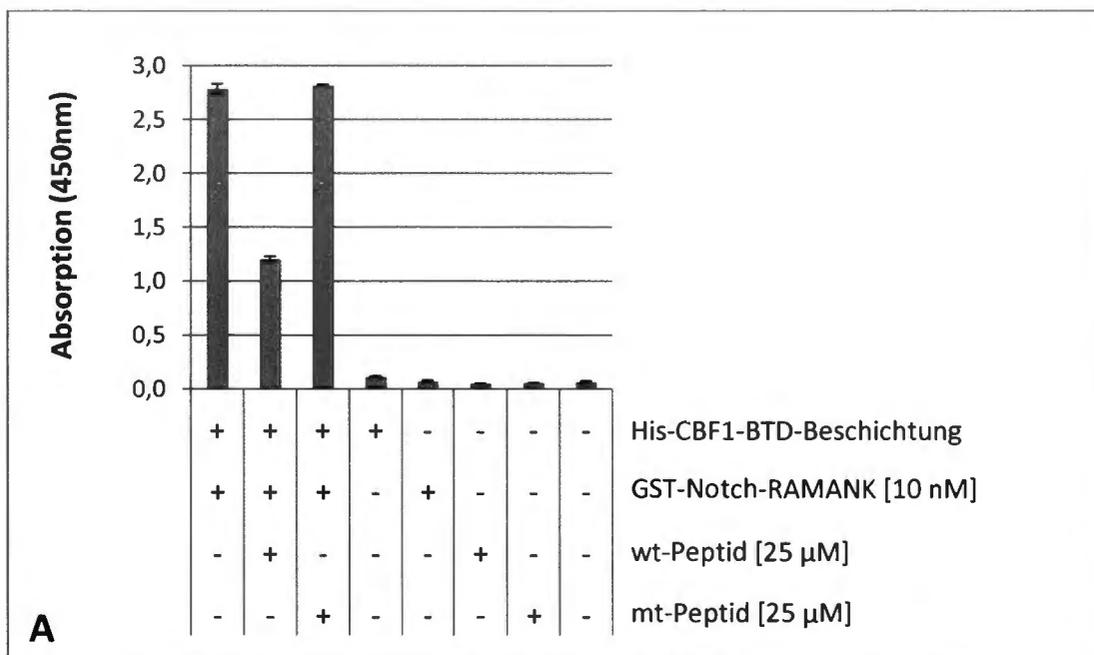
„small molecule“-Bank	Anzahl der chemischen Substanzen	MW [Da] (im Durchschnitt)	Konzentration im HTS [μM]
SPECS	400	ca. 400	40 - 342
AnalytiCon Discovery	800	ca. 280	22 - 80
Naturstoffbank NHC	160	nicht bekannt	ca. 5

Tabelle 20: Für die „small molecule screens“ verwendeten „small molecule“-Banken

4.3.1 „Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC mit dem ELISA-basierten Testsystem

Der „small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC wurde im Rahmen einer Kooperation am HZI in Braunschweig durchgeführt. Dort war es möglich Pipettierroboter zu verwenden, so dass der „small molecule screen“ im 384-Loch-Format durchgeführt wurde. Wie zuvor beschrieben, wurde die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK in einer Konzentration von 10 nM in Gegenwart der „small molecules“ in einer Konzentration von 5 μM detektiert. Als Referenz wurden mehrere parallele Messungen, zur Kontrolle der biologischen Aktivität der Interaktionspartner, auf der gleichen 384-Loch-Platte durchgeführt. Zum einen wurde das maximale Signal, das durch die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK ohne Zusatz von Naturstoffen entsteht, gemessen. Zum anderen wurde überprüft, ob die CBF1/Notch Interaktion in diesem „screen“ mit wt-Peptid, welches das WxP-Motiv beinhaltet oder mit mt-Peptid, ohne WxP-Motiv, in einer Endkonzentration von 25 μM inhibiert werden kann. Außerdem wurde das Hintergrundsignal bestimmt, das durch die verwendeten Proteine oder Peptide jeweils getrennt entsteht. Abbildung 22 A zeigt die Mittelwerte und

Standardabweichungen von drei Einzelwerten der Kontrollreaktionen. Die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK führte zu einem deutlich messbaren Signal, welches durch das wt-Peptid inhibiert werden konnte. Folglich ist die CBF1/Notch-Interaktion in diesem „screen“ reversibel, weshalb es möglich sein sollte, dass ein Naturstoff mit inhibitorischen Potential diese Protein/Protein-Wechselwirkung hemmt. Das mt-Peptid hatte keinen Einfluss auf das Signal. Die einzelnen Interaktionspartner zeigten eine Absorption, die dem Hintergrundsignal entsprach. In Abbildung 22 B sind nochmals die Mittelwerte des maximalen Signals und des minimalen Signals als durchgehende Linien dargestellt. Der Toleranzbereich dieser Mittelwerte wird durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung ($\pm 3SD$) bestimmt und durch unterbrochene Linien begrenzt. Die Referenzwerte sollen in dieser Abbildung dazu dienen, mögliche inhibitorische „small molecules“ leichter zu erkennen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Einzelwerten des Signals, das durch die CBF1/Notch-Interaktion in Gegenwart von Naturstoffen entsteht, sind als gelbe Punkte dargestellt. Die Standardabweichung ist so gering, dass sie nicht über die Punkte hinausgeht und unsichtbar bleibt. Das Signal nach Zugabe der meisten Naturstoffe befand sich innerhalb des Toleranzbereiches für das maximale Signal. Sechs Naturstoffe verstärkten das Signal. Da sich diese sechs Naturstoffe in einer Spalte befinden, beruht diese Änderung des Signals vermutlich auf einem Positionseffekt.



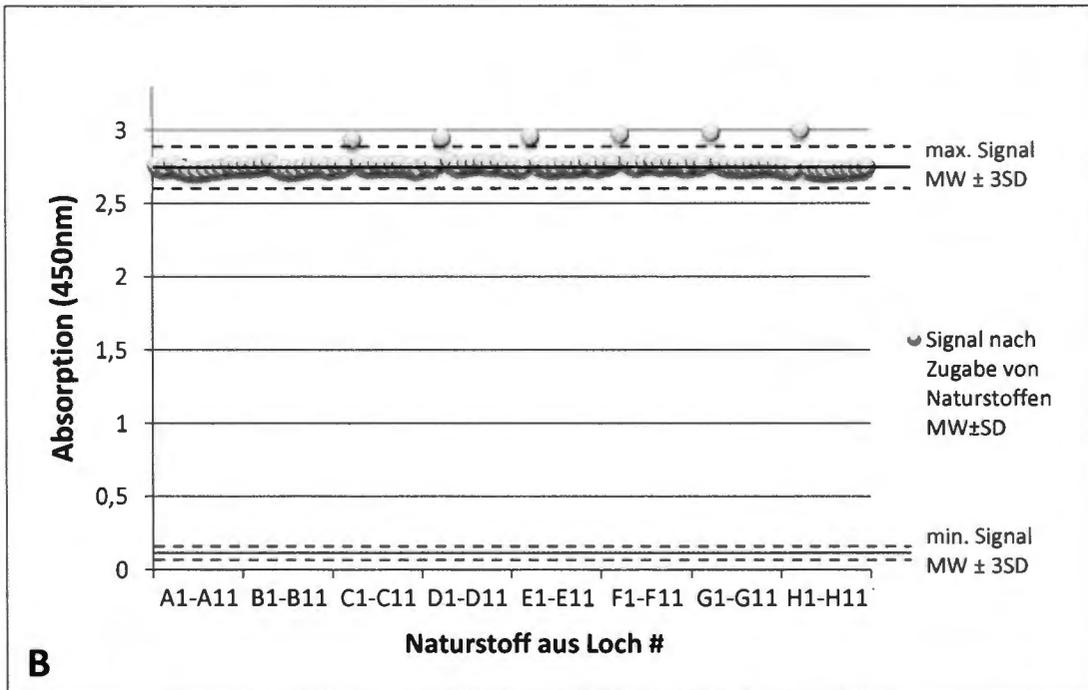


Abbildung 22: „Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC mit dem ELISA-basierten Testsystem

Parallel zu dem „small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC wurde die biologische Aktivität der Proteine durch die Bestimmung von Referenzwerten überprüft. In Abbildung (A) sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3-fachwerten der Referenzwerte für die Absorption dargestellt. Die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK in einer Endkonzentration von 10 nM führt zu einem deutlich messbaren Signal, das nur spezifisch durch ein wt-Peptid mit WxP-Motiv in einer Endkonzentration von 25 μ M inhibiert wird. Die Zugabe der gleichen Menge an mt Peptid, ohne WxP-Motiv, hat keinen Einfluss auf das Signal. Die verwendeten Proteine und Peptide führen einzeln zu keinem messbaren Signal. In (B) sind die Mittelwerte von zwei Einzelwerten des Signals, das durch die CBF1-abhängige Bindung von GST-Notch-RAMANK in Gegenwart von unterschiedlichen Naturstoffen entsteht, als gelbe Punkte dargestellt. Die Standardabweichung ist so gering, dass sie nicht über die Punkte hinausgeht und deshalb unsichtbar ist. Die Mittelwerte für das maximale Signal der CBF1/Notch-Interaktion und das Hintergrundsignal sind als durchgehende Linien dargestellt. Die Toleranzbereiche der Mittelwerte werden durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichungen ($\pm 3SD$) definiert und von unterbrochenen Linien begrenzt. Die Absorptionssignale befinden sich auch nach der Zugabe von Naturstoffen, bis auf sechs Ausnahmen, im Toleranzbereich für das maximale Signal. Sechs der Moleküle verursachen einen Anstieg des Signals.

4.3.2 Validierung des ELISA-basierten „small molecule screens“ der Naturstoffbank NHC

Um sicher zu stellen, dass in dem durchgeführten Screen der Naturstoffbank NHC die erforderlichen Qualitätsstandards eingehalten worden waren, wurde der Z-Faktor mit Formel (7) berechnet. Dieser unterscheidet sich vom Z'-Faktor dahingehend, dass hier die Absorptionswerte, die nach der Zugabe von „small molecules“ gemessen werden, in die Berechnung einbezogen werden.

(7)

$$Z = \frac{(MW_{inh} - 3 \times SD_{inh}) - (MW_{min} - 3 \times SD_{min})}{MW_{inh} - MW_{min}}$$

Z = Z – Faktor

MW_{inh} = Mittelwert des Absorptionssignals nach „small molecule“ Zugabe

MW_{min} = Mittelwert Hintergrundsignal

SD_{inh} = Standardabweichung des Absorptionssignals nach „small molecule“ Zugabe

SD_{min} = Standardabweichung Hintergrundsignal

Der Z-Faktor für den „small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC hat einen Wert von 0,94. Dieser Wert zeigt, dass die Rahmenbedingungen zur Identifizierung eines inhibitorischen „small molecules“ geeignet waren, auch wenn in dieser Bank kein Inhibitor der CBF1/Notch-Interaktion identifiziert werden konnte. Auch in der „small molecule“-Bank des Helmholtz Zentrums von der Firma AnalytiCon GmbH oder der Naturstoffbank von Specs war kein inhibitorisches Molekül für die Interaktion des WxP-Motivs von Notch mit der hydrophoben Bindetasche von der BT-Domäne von CBF1 vorhanden.

4.4 Zellbasiertes Testsystem zur Identifizierung inhibitorischer „small molecules“

Das zellbasierte Testsystem sollte einerseits als unabhängiger „small molecule screen“ dazu dienen, Hemmstoffe zu identifizieren, welche die CBF1-abhängige Transaktivierung durch EBNA2 verhindern. Andererseits könnte dieses Testsystem auch als Sekundärtest verwendet werden, um Inhibitoren, die bei einem „small molecule screen“ mit dem ELISA-basierten Testsystem identifiziert wurden, zu bestätigen. Mit dem zellbasierten Testsystem ist es möglich, in einer Messung gleichzeitig zu überprüfen, ob „small molecules“ erstens die CBF1-abhängige Transaktivierung durch EBNA2 inhibieren können und zweitens eine toxische Wirkung auf die Zellen haben. Das zellbasierte Testsystem beruht auf zwei Suspensionszelllinien, einer Indikatorzelllinie und einer Kontrollzelllinie, die beide das Reporterprotein GFP konditional exprimieren. Das konditionale System gestattet die Durchführung des „screens“ bei halbmaximaler Signalstärke, so dass eine Inhibition durch „small molecules“ ermöglicht wird. Mittels Durchflusszytometrie können gleichzeitig die Expression von GFP und der Anteil der lebenden Zellen im FSC/SSC (Kapitel 3.2.4, S. 40) bestimmt werden. Die charakteristischen Eigenschaften der Zelllinien für das zellbasierte Testsystem werden im Folgenden genauer vorgestellt.

4.4.1 Die Indikatorzelllinie JV06

In der Indikatorzelllinie JV06 kann die Expression des Reporterproteins GFP („green fluorescent protein“) induziert und dann die Fluoreszenzintensität von GFP mittels FACS-Messungen bestimmt werden. Die Indikatorzelllinie basiert auf der Zelllinie SM295 D6 (Maier et al., 2005), die ein Fusionsprotein aus EBNA2 und der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) exprimiert. In der Abwesenheit von Östrogen (E) verhindert die Bindung von Chaperonen, wie z.B. das „heat shock protein“ HSP90, an das Fusionsprotein ER/EBNA2, die Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus und blockiert dadurch die biologische Aktivität von EBNA2. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zelllinie SM295 D6 zusätzlich mit einem Plasmid transfiziert, das episomal repliziert und unter Selektion mit dem Antibiotikum Hygromycin stabil segregiert. Dieses Plasmid kodiert für das Reporterprotein GFP, dessen Expression unter der Kontrolle eines spontan nicht aktiven Minimalpromotors und zwölf CBF1-Bindestellen, die als CBF1-responsive Element (CBF1-RE) bezeichnet werden, steht. Das CBF1 Protein wird in der Indikatorzelllinie JV06 konstitutiv exprimiert, so dass es vermutlich an mehrere der CBF1-RE bindet. Die CBF1 Bindung

alleine führt allerdings nicht zur Transaktivierung des Reportergens GFP. Durch Zugabe von Östrogen (E) in das Kulturmedium bindet Östrogen an die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) und führt zu der Auflösung des Komplexes aus HSP90 und ER/EBNA2. Das Fusionsprotein ER/EBNA2 kann nun in den Zellkern translozieren und an CBF1 binden. Die Bildung des CBF1/EBNA2-Komplexes, führt zur Aktivierung der Transkription des Reporterproteins GFP. In Abbildung 23 sind diese charakteristischen Merkmale der Indikatorzelllinie JV06 dargestellt.

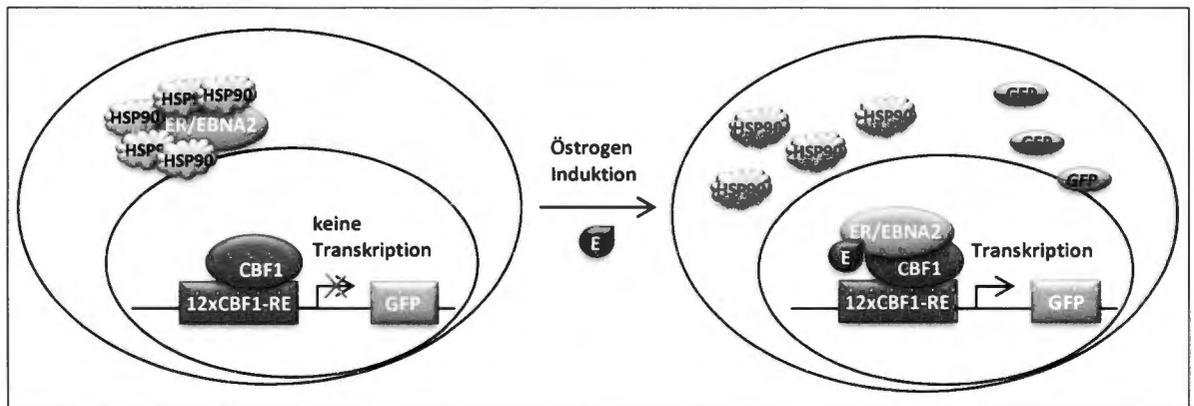


Abbildung 23: Die charakteristischen Merkmale der Indikatorzelllinie JV06

In der Zelllinie JV06 wird konstitutiv ein Fusionsprotein (ER/EBNA2) aus EBNA2 mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) exprimiert, das in der Abwesenheit von Östrogen (E) durch Chaperone wie zum Beispiel das „heat shock protein 90“ (HSP90) gebunden und im Zytoplasma zurückgehalten wird. Im Zellkern der Zelllinie befindet sich ein episomal replizierendes GFP („green fluorescent protein“)-Reporterplasmid, das unter Selektion stabil segregiert. Die GFP-Expression steht unter Kontrolle eines spontan nicht aktiven Minimalpromotors und einer Serie von 12 CBF1-Bindestellen (CBF1-RE). Da CBF1 in der Zelllinie JV06 konstitutiv exprimiert wird, ist vermutlich die Mehrzahl dieser CBF1-RE mit CBF1 besetzt, was jedoch noch nicht zur Transaktivierung führt. Erst durch Zugabe von Östrogen (E), das an ER bindet, dissoziiert der ER/EBNA2/Chaperonkomplex und ER/EBNA2 kann in den Zellkern gelangen. Dort bildet ER/EBNA2 zusammen mit CBF1 einen Komplex, der zur Induktion der GFP-Expression führt.

In der Indikatorzelllinie JV06 ist die GFP-Expression von der CBF1-vermittelten Transaktivierung durch EBNA2 abhängig. Allerdings kann eine Abnahme des GFP-Signals auch durch die Hemmung von EBNA2-unabhängigen Prozessen verursacht werden. Um die Spezifität der Inhibition zu überprüfen, ist die Durchführung von weiteren Experimenten notwendig.

4.4.2 Die Kontrollzelllinie MR31.6

Eine Kontrollzelllinie, die in unserem Labor etabliert und für die Überprüfung der spezifischen Inhibition der EBNA2-abhängigen Transaktivierung verwendet wurde, ist die Zelllinie MR31.6. In der Kontrollzelllinie MR31.6 wird das Reporterprotein GFP unabhängig von EBNA2 exprimiert. Sie basiert auf der Zelllinie SM296 D3 (Maier 2005), welche das Fusionsprotein ER/EBNA2 exprimiert, das ohne Zugabe des Induktors Östrogen durch HSP90 im Zytoplasma zurückgehalten wird. Zusätzlich wird das CBF1-Protein nicht exprimiert, so dass es seine Funktion als DNA-Adapter nicht ausüben kann. Um die Kontrollzelllinie zu erhalten, wurde die Zelllinie SM296 D3 zusätzlich mit einem Vektor transfiziert, der episomal repliziert und unter Selektion mit dem Antibiotikum Puromycin stabil segregiert. Dieser Vektor kodiert für das Reporterprotein GFP und für ein nicht funktionelles Fragment des „neuronal growth factor receptors“ (NGFR). Die Expression beider Proteine steht unter der Kontrolle des bidirektionalen Promotors P_{Tet}^{bi-1} und kann durch die Zugabe des zu Tetrazyklin verwandten Doxyzyklins (D) reguliert werden (Bornkamm et al., 2005). Für die Regulation des Promotors P_{Tet}^{bi-1} sind zwei zusätzliche Regulatorproteine, tTS^{KRAB} und $rtTA2^S$ -M2, erforderlich, die Derivate des bakteriellen Tet-Repressors sind. In dem transfizierten Vektor werden diese zwei Regulatorproteine von einer bicistronischen Expressionskassette kodiert und konstitutiv exprimiert. tTS^{KRAB} ist ein Fusionsprotein aus dem bakteriellen Tet-Repressor und der KRAB Repressor Domäne des Kox1-Proteins von Säugern (Forster et al., 1999). tTS^{KRAB} bindet in der Abwesenheit von Doxyzyklin (D) an den P_{Tet}^{bi-1} Promotor, so dass die Transkription von Reportergenen, in unserem Fall GFP und NGFR, verhindert wird. Vereinfacht wird tTS^{KRAB} auch als TetRep bezeichnet, da es die Expression der Reportergene verhindert. Nach Zugabe von Doxyzyklin (D), das an TetRep bindet, dissoziiert der TetRep/Doxyzyklin-Komplex von P_{Tet}^{bi-1} . $rtTA2^S$ -M2 ist ein Fusionsprotein des bakteriellen Tet-Repressors und einem Transkriptionellen Aktivator von VP16, der zusätzlich eine Mutation beinhaltet (Urlinger et al., 2000). Das Regulatorprotein $rtTA2^S$ -M2 wird auch als Tetrazyklin-abhängiger Aktivator (TetAkt) bezeichnet. Es kann ebenfalls mit Doxyzyklin (D) interagieren und als TetAkt/Doxyzyklin-Komplex an den P_{Tet}^{bi-1} Promotor binden. Dort induziert TetAkt die Transkription von NGFR und GFP. Die Charakteristika der Kontrollzelllinie MR31.6 sind in Abbildung 24 dargestellt.

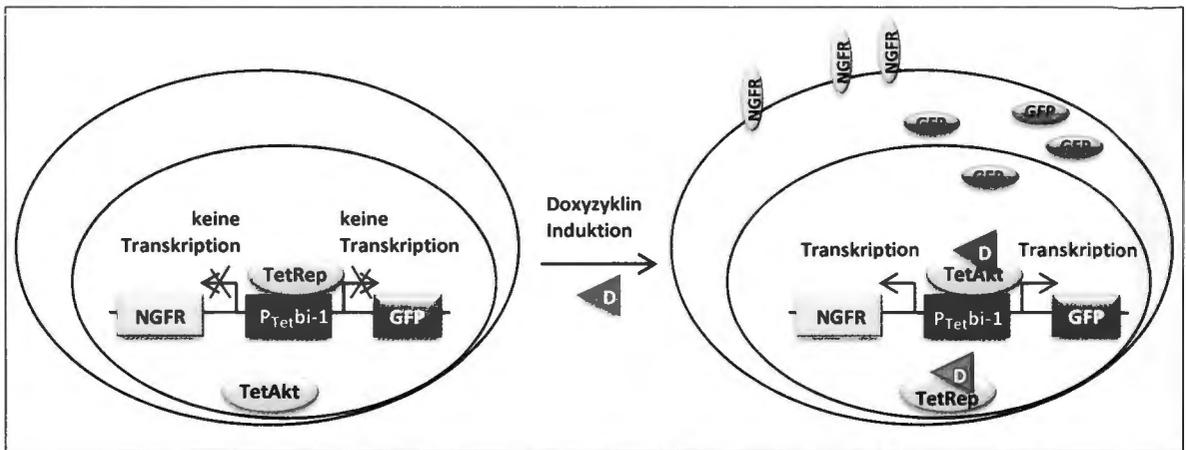


Abbildung 24: Die charakteristischen Merkmale der Kontrollzelllinie MR31.6

Auch die Zelllinie MR31.6 trägt ein GFP-Reporterplasmid, das unter Selektion stabil segregiert. Dieses Reporterplasmid enthält einen bidirektionalen Promotor (P_{Tet}^{bi-1}) zur simultanen Expression von GFP und eines nicht funktionellen Fragments des „neural growth factor receptors“ (NGFR). Die Aktivität von P_{Tet}^{bi-1} kann durch das Tetrazyklin verwandte Doxyzyklin (D) induziert werden, da dieser Promotor durch zwei Doxyzyklin bindende Regulatorproteine kontrolliert wird. Die Regulatorproteine werden konstitutiv exprimiert und sind Derivate des bakteriellen Tet-Repressors. TetAkt ist ein von Doxyzyklin abhängiger Transaktivator, der nach Doxyzyklininduktion an den Tet-Operator bindet. TetRep ist ein transkriptioneller Repressor, der nach Doxyzyklinbindung nicht mehr an den Tet-Operator binden kann. In Abwesenheit von Doxyzyklin (D) blockiert TetRep die spontane Expression der Reportergene (Bornkamm et al., 2005). Nach Zugabe von Doxyzyklin (D) zu der Kontrollzelllinie wird die Transkription von NGFR und GFP durch TetAkt induziert.

In der Kontrollzelllinie MR31.6 wird das Reporterprotein GFP nur aufgrund des Doxyzyklin abhängigen Transaktivators rtTA2^S-M2 exprimiert und ist EBNA2-unabhängig. „Small molecules“, die spezifisch die Transaktivierung durch EBNA2 hemmen, sollten die EBNA2-unabhängige GFP-Expression nicht beeinflussen. Wird die GFP-Expression in der Kontrollzelllinie gehemmt, so inhibiert das „small molecule“ einen Prozess, der für die Expression von Proteinen im Allgemeinen notwendig ist.

4.5 Etablierung der Versuchsbedingungen für das zellbasierte HTS-Verfahren

Damit das zellbasierte Testsystem für einen „small molecule screen“ im Hochdurchsatz (HTS) verwendet werden konnte, mussten die Versuchsbedingungen folgende Anforderungen erfüllen. Erstens sollte die Versuchsdauer möglichst gering sein, da nicht bekannt ist, wie stabil die unterschiedlichen „small molecules“ unter den Kulturbedingungen der Zelllinien sind. Deshalb wurde zunächst die Induktionsdauer ermittelt, die notwendig ist, um die GFP-Expression deutlich mittels Durchflusszytometrie messen zu können (Kapitel 4.5.1, S. 103). Für die Messung der GFP-Expression wurden zwei unterschiedliche Geräte, das BD FACSCalibur™ und das BD LSR-II™, verwendet. Je nach Gerät waren die absoluten Messwerte des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz unterschiedlich. Für die Auswertung der Experimente sind allerdings nur die relativen Messwerte von Bedeutung. Zweitens war es wichtig, dass die Expression des Reporterproteins zu einem halbmaximalen Signal der GFP-Fluoreszenz führt. Wie auch schon in den biochemischen ELISA-basierten Testsystemen, sollte eine Sättigung des Signals verhindert werden, um die Inhibition zu ermöglichen. Die effektiven Induktor-Konzentrationen, welche zu einer halbmaximalen GFP-Fluoreszenzintensität führen, wurden sowohl für die Indikatorzelllinie JV06, als auch für die Kontrollzelllinie MR31.6 bestimmt (Kapitel 4.5.2, S. 105). Drittens musste sichergestellt werden, dass sich die Reaktionsbedingungen für den Einsatz im HTS eignen. Zu diesem Zweck wurden, wie für die ELISA-basierten Testsysteme, das Signal-Window und der Z'-Faktor berechnet (Kapitel 4.5.3, S. 106). Schließlich musste überprüft werden, ob das Lösungsmittel DMSO einen Einfluss auf das GFP-Signal hat, da die meisten „small molecule“-Banken in DMSO als Lösungsmittel vorliegen (Kapitel 4.5.4, S. 110).

4.5.1 Welche Induktionsdauer ist für eine messbare GFP-Expression notwendig?

Da die Inhibition mit einer Abnahme des Fluoreszenzsignals von GFP einhergeht, musste sichergestellt werden, dass der Ausgangswert des Signals deutlich messbar ist. Zunächst wurde bestimmt, für welche Zeitspanne die Zellen der Indikatorzelllinie mit Östrogen induziert werden müssen, damit ein deutlich messbares Fluoreszenzsignal des GFP-Proteins entsteht. Um die Induktionsdauer zu ermitteln, wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur in einer 96-Loch-Platte ausgesät und mit Östrogen in Endkonzentrationen von 1 nM bis 100 nM induziert. 3, 6 und 16 h nach der Induktion wurde die Fluoreszenzintensität von GFP der lebenden Zellen mit dem BD

FACSCalibur™ gemessen (Kapitel 3.2.4, S. 40). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Einzelwerte des Geometrischen Mittels (Geom. Mean) sind für die Zeitspannen von 3, 6 und 16 h (h) gegen die Östrogenkonzentrationen in logarithmischer Skalierung aufgetragen (Abbildung 25).

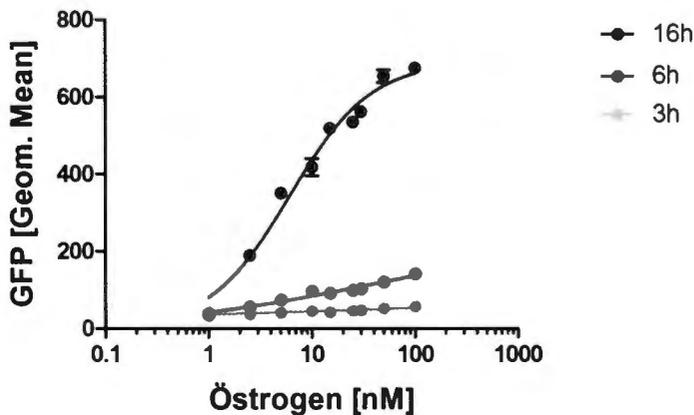


Abbildung 25: Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Zelllinie JV06

$7,5 \times 10^4$ Zellen wurden pro Kultur in 96-Loch-Platten ausgesät und die GFP-Expression mit Östrogen in einer Endkonzentration von 1 nM bis 100 nM induziert. 3, 6 und 16 h (h) nach Induktion wurde die Fluoreszenzintensität von GFP von jeweils drei Parallelkulturen mittels des BD FACSCalibur™ gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Geometrischen Mittelwerts (Geom. Mean) der GFP-Fluoreszenz aus der Messung von Triplikaten. Erst bei einer Induktionsdauer von 16 h (dunkelblau) sieht man eine deutliche messbare Veränderung des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz auch bei geringen Östrogenkonzentrationen.

Die Induktion der GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 mit Östrogen zeigt nach 3 Stunden keinen, aber auch nach 6 Stunden nur einen geringen Effekt. Erst durch die Inkubation der Zellen für 16 h mit unterschiedlichen Mengen Östrogen steigt das GFP-Fluoreszenzsignal exponentiell und hebt sich auch schon bei geringeren Induktor-Konzentrationen deutlich von der Hintergrundfluoreszenz ab. Da erst nach 16 h ein deutliches Fluoreszenzsignal in der Indikatorzelllinie entsteht, wurde diese Induktionsdauer in den folgenden Experimenten angewendet.

4.5.2 Welche Induktor-Konzentrationen führen zu einem halbmaximalen Signal der GFP-Fluoreszenz?

Die effektive Konzentration des Induktors (EC_{50}), die zu einer halbmaximalen Expression des GFP-Proteins und somit zu einer halbmaximalen GFP-Fluoreszenzintensität führt, wurde sowohl für die Indikatorzelllinie JV06 als auch für die Kontrollzelllinie MR31.6 bestimmt. $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur wurden in 96-Loch-Platten ausgesät und im Fall der Indikatorzelllinie mit Östrogen in Endkonzentrationen von 0,1 nM bis 200 nM oder im Fall der Kontrollzelllinie mit Doxyzyklin in Endkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 20 ng/ml induziert. In beiden Zelllinien wurde 16 h nach der Induktion die Fluoreszenzintensität des GFP-Proteins in den lebenden Zellen bestimmt. Die Werte des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz wurden ausgehend vom maximalen Signal, das 100% gleichgesetzt wurde, umgerechnet. In Abbildung 26 ist ein repräsentatives Ergebnis von vier Experimenten dargestellt. Die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils drei Parallelkulturen sind in Abhängigkeit von der Endkonzentration des Induktors in logarithmischer Skalierung aufgetragen.

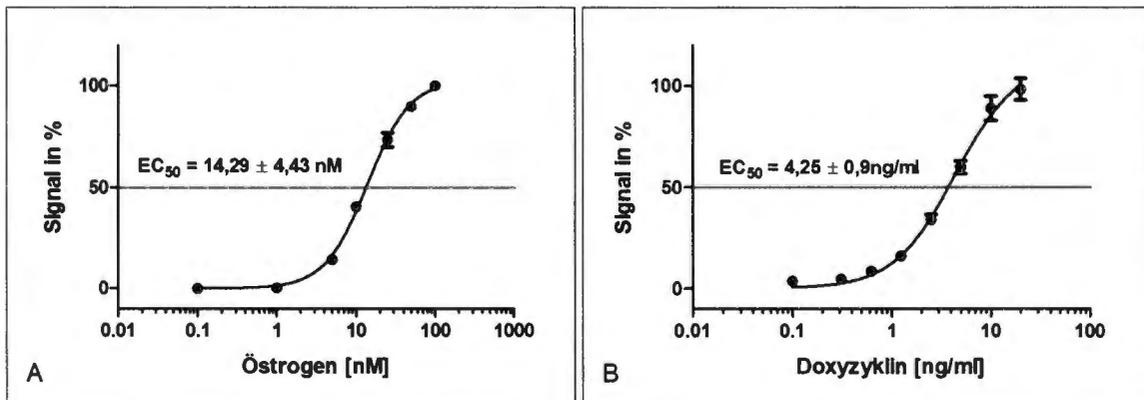


Abbildung 26: Bestimmung der Konzentration des Induktors, die zur halbmaximalen Expression des Reporterproteins GFP in den Indikatorzelllinien notwendig ist

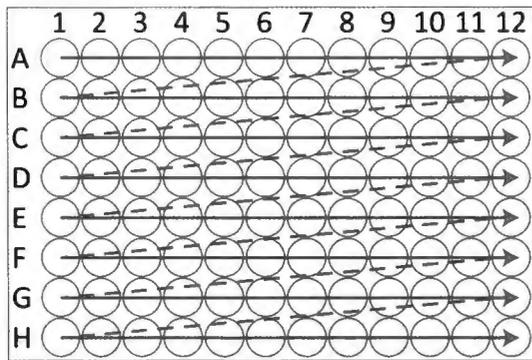
$7,5 \times 10^4$ Zellen wurden pro Kultur in einer 96-Loch-Platte ausgesät und mit Östrogen in Endkonzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM für die Zelllinie JV06 (A) bzw. mit Doxyzyklin in Endkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 20 ng/ml für die Zelllinie MR31.6 induziert (B). Nach 16 h wurde die GFP-Fluoreszenzintensität von jeweils drei Parallelkulturen durch Messung mit dem BD FACSCalibur™ bestimmt. Die Werte des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz von lebenden Zellen wurden so umgerechnet, dass die maximale GFP-Fluoreszenzintensität 100% entspricht. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Parallelkulturen wurden gegen die Induktionskonzentration in einer logarithmischen Skalierung aufgetragen. Mit der Software GraphPad Prism 5 wurde die effektive Konzentration (EC_{50})

des Induktors ermittelt, die zur halbmaximalen Expression und somit zur halbmaximalen Fluoreszenzintensität von GFP führt.

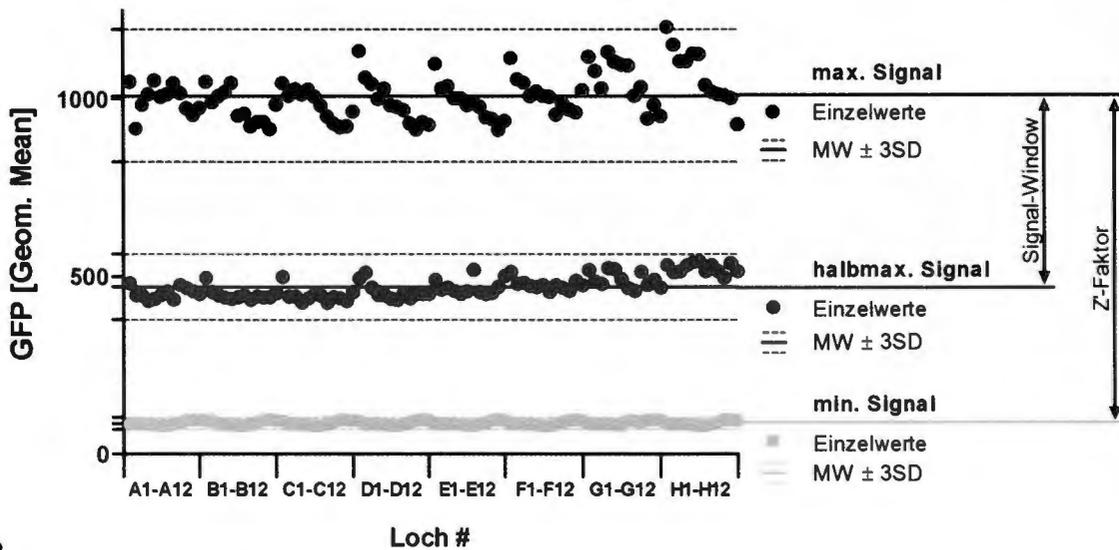
Die EC_{50} -Werte für die Endkonzentration zur Induktion der GFP-Expression stellen Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils vier unabhängigen Experimenten dar. Sie betragen in der Indikatorzelllinie JV06 $14,29 \pm 4,43$ nM Östrogen und in der Kontrollzelllinie MR31.6 $4,2 \pm 0,9$ ng/ml Doxyzyklin. Für die folgenden Experimente wurden Induktor-Konzentrationen von 10 nM Östrogen und 2,5 ng/ml Doxyzyklin verwendet.

4.5.3 Kann das zellbasierte Testsystem, unter den gewählten Reaktionsbedingungen, für HTS verwendet werden?

Auch für das zellbasierte Testsystem mit der Indikatorzelllinie JV06 wurden das Signal-Window und der Z'-Faktor ermittelt, um sicher zu gehen, dass sich diese Methode eignet, „small molecule“-Banken im Hochdurchsatz auf ihre inhibitorische Eigenschaften zu überprüfen. Wie schon erwähnt, wird das Signal-Window durch Messung des maximalen und halbmaximalen Signals bestimmt. Der Z'-Faktor kann mit Hilfe der Messwerte des maximalen und minimalen Signals berechnet werden. Um das Signal-Window und den Z'-Faktor des zellbasierten Testsystems zu ermitteln, wurden jeweils $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur in mehreren 96-Loch-Platten ausgesät. Eine Platte wurde mit Östrogen in einer Endkonzentration von 10 nM induziert, um das maximale GFP-Fluoreszenzsignal zu erhalten, welches das Ausgangssignal im HTS darstellt. Eine weitere 96-Loch-Platte wurde mit Östrogen in einer Endkonzentration von 5 nM induziert, um das halbmaximale GFP-Fluoreszenzsignal zu erhalten. Für das Hintergrundsignal, welches dem minimalen Signal entspricht, wurden die Zellen der Indikatorzelllinie JV06 mit Puffer induziert. 16 h nach der Induktion wurde die GFP-Fluoreszenzintensität der lebenden Zellen mit dem FACS BD LSR-II™ unter Verwendung des Hochdurchsatzadapters gemessen. In Abbildung 27 A ist der Ablauf der Messung, die reihenweise jeweils von Loch 1 bis 12 erfolgte, dargestellt. Abbildung 27 B zeigt die Einzelwerte des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenzintensität jeder Kultur der Platten. Die Mittelwerte (MW) für das maximale, halbmaximale und minimale Signal sind als durchgehende Linien dargestellt. Der Toleranzbereich für jeden Mittelwert wird durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung ($\pm 3SD$) beschrieben und wird hier durch unterbrochene Linien begrenzt.



A → Messrichtung



B

Abbildung 27: Ermittlung des Signal-Windows des auf der Zelllinie JV06 basierten Testsystems

Für die Berechnung des Signal-Windows wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Die GFP-Expression wurde mit Östrogen-Endkonzentrationen von 10 nM für die maximale und von 5 nM für die halbmaximale GFP-Expression induziert. Nach 16 h wurde der Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz am BD LSR-II™ ermittelt. In (A) ist die Abfolge der Messung dargestellt, die reihenweise von 1 bis 12 erfolgte. In (B) sind die Einzelwerte des Geom. Mean der GFP-Expression nach Induktion mit unterschiedlichen Östrogen-Endkonzentrationen als Punkte dargestellt. Die Mittelwerte (MW) des maximalen, halbmaximalen und minimalen Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz sind als durchgehende Linien dargestellt. Die Toleranzbereiche der Mittelwerte werden durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichungen ($\pm 3SD$) definiert und von unterbrochenen Linien begrenzt.

Vor allem bei den Einzelwerten des maximalen Signals ist ein Positionseffekt zu erkennen. Die reihenweise Messung führt dazu, dass die später gemessenen Werte ein höheres Signal zeigen.

Außerdem fällt auf, dass innerhalb einer Reihe der Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz sinkt. Diese Schwankungen führen zu einer größeren Standardabweichung und somit auch zu größeren Toleranzbereichen, die sich im Wert des Signal-Window bemerkbar machen.

Die Berechnung des Signal-Window (SW) des zellbasierten Testsystems erfolgte mit der in Kapitel 4.2.2 (S. 85) dargestellten Formel (1).

$$SW_{\text{zellbasiert}} = \frac{(1009,49 - 3 \times 62,27) - (471,54 + 3 \times 30,76)}{62,27}$$

$$SW_{\text{zellbasiert}} = 4,16$$

Das Signal-Window des zellbasierten Testsystems hat einen Wert von 4,16. Dieser Wert bestätigt, dass sich dieses Testsystem auch für einen „small molecule screen“ im Hochdurchsatz eignet.

Anhand der Messwerte, die für die Berechnung des Signal-Window verwendet wurden, sollte auch ermittelt werden, welche Inhibition des GFP-Fluoreszenzsignals notwendig ist, um ein tatsächlich inhibitorisches Molekül zu identifizieren. Deshalb wurden die erforderlichen Werte nach den Formeln (2) und (4) umgerechnet.

$$h_{\text{inh}} = \frac{1009,49 - (1009,49 - 3 \times 62,27)}{1009,49} \times 100\%$$

$$h_{\text{inh}} = 18,5\%$$

$$\sigma_{\text{inh } 0} = \frac{62,27}{1009,49} \times 100\%$$

$$\sigma_{\text{inh } 0} = 6,18\%$$

h_{inh} = Inhibition an der Toleranzgrenze von MW_{max} in %

$\sigma_{\text{inh } 0}$ = SD_{max} in % des maximalen Absorptionssignals

Schließlich wurden diese Werte zur Berechnung der kumulativen Verteilungsfunktion der Normalverteilung (Φ) für die Wahrscheinlichkeit p(Hit) nach Formel (5) mit dem Programm Mathematica 8 verwendet (Kapitel 4.2.2, S. 87).

Abbildung 28 stellt die Verteilungsfunktion der Wahrscheinlichkeit p(Hit) graphisch dar. Der Kurvenverlauf der Hit-Wahrscheinlichkeit ist gelb dargestellt. Die Inhibition an der Toleranzgrenze h_{inh} wird durch eine blaue, unterbrochene Linie markiert. Entspricht die Inhibition eines „small molecules“ der Signalminderung an der Toleranzgrenze h_{inh} , so beträgt die Wahrscheinlichkeit p(Hit) = 0,5. Eine rote durchgehende Linie markiert die Abnahme des

Signals, welche notwendig ist, um mit $p(\text{Hit}) = 1$ einen potentiellen Inhibitor zu identifizieren. Die Inhibition an der Toleranzgrenze h_{inh} entspricht einer Abnahme des Signals um 18,5%. Ab einer Signalminderung von 37% liegt die Wahrscheinlichkeit bei $p(\text{Hit}) = 1$. Das bedeutet, dass jedes „small molecule“, welches das Absorptionssignal um mindestens 37% hemmt, ein potentieller Inhibitor der CBF1/EBNA2-Interaktion ist.

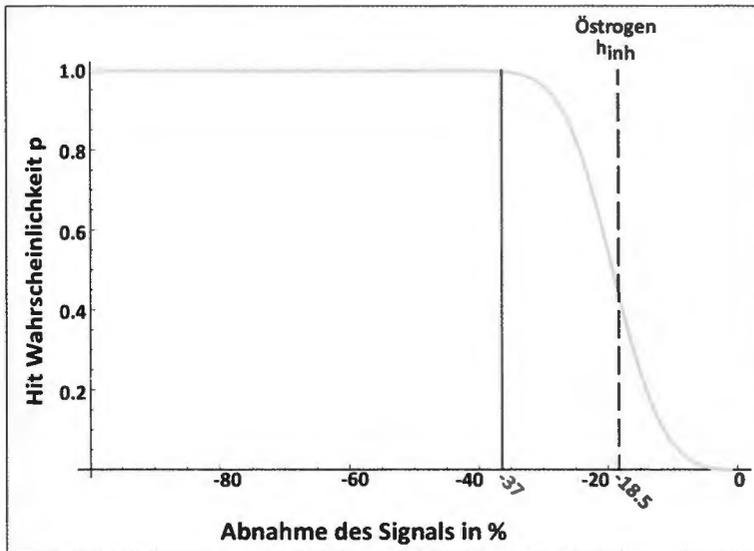


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Hit-Wahrscheinlichkeit in dem zellbasierten Testsystem

Die Kurve der Verteilung der Hit-Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Abnahme des Signals wurde graphisch in Gelb dargestellt. Die Toleranzgrenze h_{inh} , bei der die Wahrscheinlichkeit $p(\text{Hit}) = 0,5$ ist, wird durch eine blaue unterbrochene Linie gekennzeichnet. Eine rote durchgehende Linie markiert, ab welcher Signalminderung die Wahrscheinlichkeit bei $p(\text{Hit}) = 1$ liegt. An der Toleranzgrenze des zellbasierten Testsystems kommt es zu einer Abnahme des Signals um 18,5%. Wird das Signal um mindestens 37% gehemmt, so ist das verantwortliche „small molecule“ ein potentieller Inhibitor der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2.

Auch die Berechnung des Z'-Faktors (Z') für das zellbasierte Testsystem erfolgte anhand der Messwerte, die in Abbildung 27 dargestellt sind. Es wurden MW_{max} , MW_{min} sowie SD_{max} und SD_{min} für das maximale und minimale Signal berechnet und in Formel (6) (Kapitel 4.2.2, S. 89) eingesetzt.

$$Z' = \frac{(1009,49 - 3 \times 62,27) - (86,15 + 3 \times 5,98)}{1009,49 - 86,15}$$

$$Z' = 0,78$$

$Z' = Z' - \text{Faktor}$

MW_{max} = Mittelwert maximales Absorptionssignal

MW_{min} = Mittelwert Hintergrundsignal

SD_{max} = Standardabweichung maximales Absorptionssignal

SD_{min} = Standardabweichung Hintergrundsignal

Der Z'-Faktor für das zellbasierte Testverfahren hat einen Wert von 0,78. Da dieser Wert größer ist als 0,5, bestätigt er, dass sich diese Methode für einen HTS eignet.

4.5.4 Welche DMSO-Konzentrationen können, ohne das GFP-Signal zu beeinflussen, in dem zellbasierten Testsystem verwendet werden?

Da die meisten „small molecule“-Banken in DMSO als Lösungsmittel vorliegen, war es notwendig, zu überprüfen, ob die Viabilität der Zellen und das Fluoreszenzsignal von GFP durch die Zugabe von DMSO beeinflusst werden. $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur wurden in 96-Loch-Platten ausgesät und mit einer Endkonzentration von 10 nM Östrogen induziert. Gleichzeitig wurde DMSO in Anteilen von 0,007% bis 1% zu den Kulturen gegeben. 16 h nach der Induktion wurde das Fluoreszenzsignal von GFP in den lebenden Zellen von jeweils drei Parallelkulturen mit dem BD FACSCalibur™ gemessen (vgl. Kapitel 3.2.4, S. 40). In Abbildung 29 sind die Mittelwerte (MW) von drei Einzelwerten für den Anteil der lebenden Zellen und den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz in den lebenden Zellen in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration aufgetragen. Die Toleranzbereiche der jeweiligen Mittelwerte werden durch die Addition und die Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung ($\pm 3SD$) beschrieben und sind als horizontale Linien dargestellt. Die Werte der GFP-Fluoreszenz befanden sich alle im Toleranzbereich der Zellen, welche nicht in Kontakt mit DMSO kamen und wurden somit durch die Zugabe von ansteigenden Mengen DMSO bis zu einem Prozent des Kulturvolumens nicht beeinflusst. Auch der Anteil der lebenden Zellen wurde durch die hier verwendeten DMSO Konzentrationen nicht beeinträchtigt.

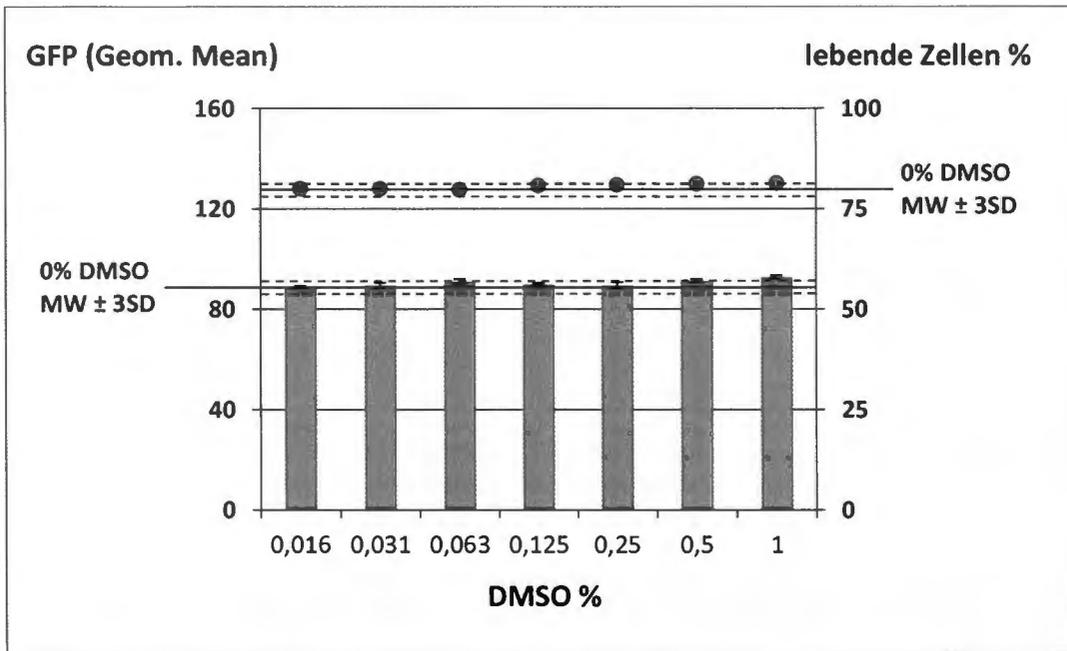


Abbildung 29: Einfluss von DMSO auf das Fluoreszenzsignal von GFP und den Anteil der lebenden Zellen

$7,5 \times 10^4$ Zellen wurden pro Kultur in einer 96-Loch-Platte ausgesät und mit Östrogen in einer Endkonzentration von 10 nM induziert. Gleichzeitig wurde DMSO in Anteilen von 0,016 bis 1% zu den Kulturen gegeben. 16 h nach Induktion wurden der Anteil der lebenden Zellen und die Fluoreszenzintensität von GFP der lebenden Zellen mit dem BD FACSCalibur™ gemessen. Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen von jeweils drei Parallelkulturen sind für den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz in Grün und den Anteil der lebenden Zellen in Blau dargestellt. Für die Kulturen, die nicht mit DMSO behandelt worden sind, wurden die Mittelwerte (MW) für den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz und den Anteil der lebenden Zellen als durchgehende Linien dargestellt. Der Toleranzbereich der Mittelwerte wird durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichungen ($\pm 3SD$) definiert und von unterbrochenen Linien begrenzt. Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen der mit DMSO behandelten Zellen sind für GFP (Geom. Mean) als blaue Balken oder für die lebenden Zellen als grüne Punkte dargestellt. Die Werte des Anteils der lebenden Zellen und der Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz liegen im Toleranzbereich der unbehandelten Zellen und werden durch DMSO in Konzentrationen von bis zu 1% des Kulturvolumens nicht beeinflusst.

Folglich können DMSO-Konzentrationen von bis zu einem Prozent des Kulturvolumens ohne Bedenken in einem HTS von „small molecule“-Banken eingesetzt werden, wenn die Indikatorzelllinie JV06 als Testsystem verwendet wird.

4.6 Inhibition der EBNA2-abhängigen Transaktivierung im zellbasierten Testsystem

Mit dem zellbasierten Testsystem wurden ebenfalls die „small molecule“-Bank von AnalytiCon Discovery des Helmholtz Zentrums München, die Naturstoffbank von Specs und die NHC Naturstoffbank des Helmholtz Zentrums in Braunschweig auf ihre inhibitorische Wirkung überprüft. Insgesamt wurde der Einfluss auf die CBF1-abhängige Transaktivierung durch EBNA2 von 1360 „small molecules“ getestet. Die Durchführung des „small molecules screens“ wird auch hier am Beispiel der 160 Substanzen aus der Naturstoffbank NHC dargestellt.

4.6.1 „Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC im zellbasierten Testsystem

Für den zellbasierten „small molecule screen“ wurden zunächst in mehreren 96-Loch-Platten $7,5 \times 10^4$ Zellen der Indikatorzelllinie JV06 pro Kultur ausgesät. Anschließend wurden „small molecules“ oder das Lösungsmittel der „small molecules“, welches entweder aus DMSO (AnalytiCon Bank des Helmholtz Zentrums München, Naturstoffbank der Firma Specs) oder PBS (Naturstoffbank NHC des HZI) bestand, hinzugefügt. Nach einer Stunde Kultur wurden die Zellen mit Östrogen induziert und weitere 16 h inkubiert. Schließlich erfolgte die FACS-Analyse der Zellviabilität (FSC/SSC) und der GFP-Fluoreszenz in den lebenden Zellen mit dem Hochdurchsatz-Adapter am Durchflusszytometer BD LSR-II™ (Kapitel 3.2.4, S. 40).

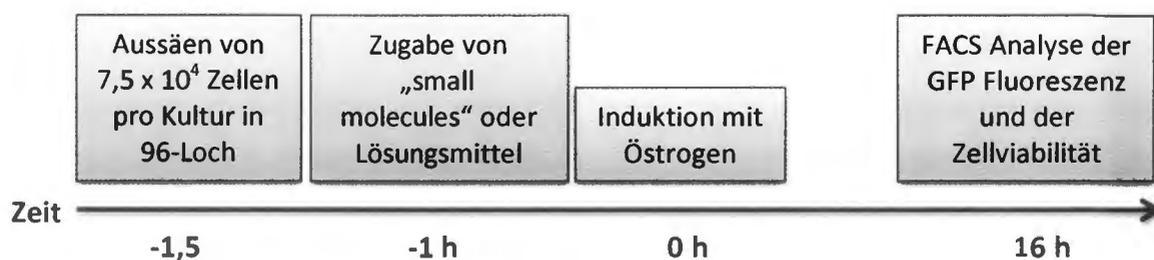


Abbildung 30: Zeitlicher Ablauf eines „small molecule screens“

Zunächst wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur in 96-Loch-Platten ausgesät und die „small molecules“ oder das Lösungsmittel der „small molecules“ dazu gegeben. Nach einer Stunde Kultur wurden die Zellen mit Östrogen induziert und nun für 16 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des Anteils der lebenden Zellen und der Fluoreszenzintensität von GFP der lebenden Zellen mit dem FACS.

In dem zellbasierten Testsystem stand keine Substanz zur Verfügung, die als Positivkontrolle für die Inhibition der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2 verwendet werden konnte. Allerdings wurde bei jedem Screen mit einer Kontrollplatte sichergestellt, dass die Induktion mit Östrogen zu einer halbmaximalen Expression von GFP führt. Außerdem wurde parallel überprüft, ob die jeweiligen Lösungsmittel der „small molecules“ (DMSO oder PBS) einen Einfluss auf die Zellen der Indikatorzelllinie JV06 hatten. Die Belegung der Kontrollplatte ist in Abbildung 31 A dargestellt. Auf jeder Platte des „small molecule screens“ wurden 80 „small molecules“ auf ihre inhibitorischen Eigenschaften überprüft. Auf der gleichen Platte wurden Kulturen ohne Östrogeninduktion und mit der Östrogenendkonzentration von 10 nM, die zur halbmaximalen GFP-Expression führt, als Referenzen gemessen. Durch diese Referenzkulturen konnten Variationen der GFP-Expression und der Viabilität der Zellen aufgrund der Dauer der Messung oder der Beschaffenheit der Zellkulturplatte erkannt werden. Die Aufteilung der Platten für den zellbasierten „small molecule screen“ veranschaulicht Abbildung 31 B.

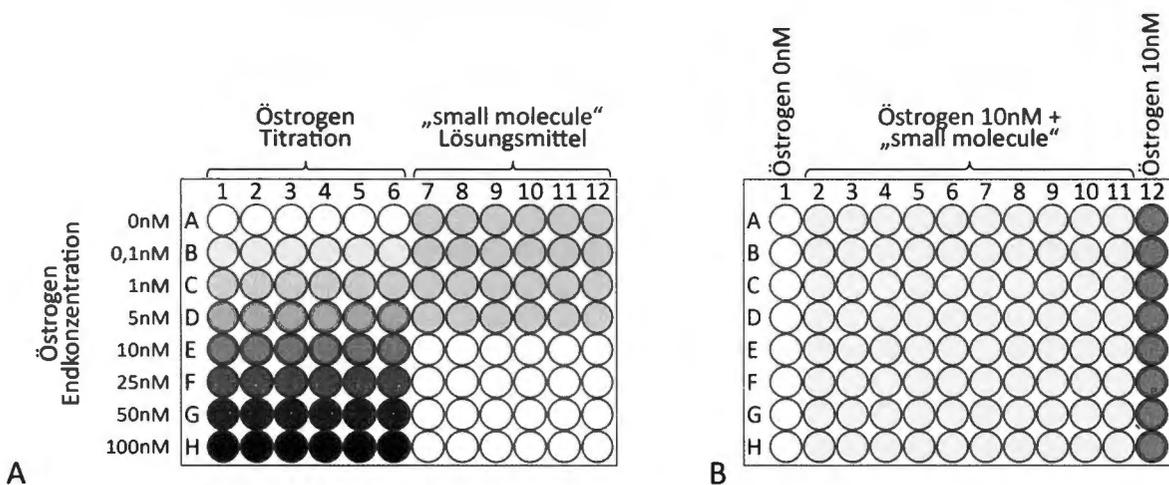


Abbildung 31: Belegung der Platten in einem „small molecule screen“

(A) Zeitgleich zur Überprüfung der inhibitorischen Fähigkeit von „small molecules“ aus verschiedenen „small molecule“-Banken, wurde auch die Funktionalität des zellulären Testsystems, basierend auf der Indikatorzelllinie JV06, kontrolliert. Dafür wurde auf einer separaten Platte die Konzentrationsabhängigkeit der Induktion von ER/EBNA2 mit Östrogen (Endkonzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM), sowie der mögliche Einfluss des Lösungsmittels der jeweiligen „small molecule“-Bank noch einmal überprüft. **(B)** Auf jeder Platte des „small molecule screens“ wurden 80 „small molecules“ getestet. Auf der gleichen Platte wurden ebenfalls Zellen ohne oder mit Östrogeninduktion gemessen, die später als Referenzkulturen zur Messung der Viabilität und der GFP-Expression ohne „small molecule“ Behandlung dienten.

Für den „small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC wurden die Zellen der Indikatorzelllinie wie in Abbildung 31 dargestellt ausgesät, induziert und die Viabilität der Zellen sowie die GFP-Expression der lebenden Zellen mit dem FACS BD LSR-II™ ermittelt. In Abbildung 32 wurden für jedes „small molecule“ die Einzelwerte des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz der lebenden Zellen gegen den Anteil der lebenden Zellen als gelbe Punkte aufgetragen. Die Mittelwerte (MW) von drei Referenzkulturen des minimalen und des maximalen GFP-Fluoreszenzsignals ohne „small molecules“, sind als durchgehende, vertikale, grüne Linien dargestellt. Der Mittelwert (MW) für den Anteil der lebenden Zellen von drei Referenzkulturen ohne „small molecule“ Zugabe ist durch eine durchgehende, horizontale, blaue Linie markiert. Die Toleranzbereiche werden durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung ($\pm 3SD$) definiert und werden durch unterbrochene Linien begrenzt. Die Werte des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz nach der Zugabe der Moleküle befinden sich zwischen den Toleranzbereichen des minimalen und maximalen Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz der Referenzkulturen. Nach der Zugabe von einigen „small molecules“ sinkt der Anteil der lebenden Zellen im Vergleich zu den Referenzkulturen. Diese Moleküle sind vermutlich toxisch für die Zellen und scheiden daher als potentielle Inhibitoren der EBNA2 vermittelten Transaktivierung aus. In Kapitel 4.5.3 (S. 106) wurde das Signal-Window für das zellbasierte Testsystem berechnet, das Auskunft darüber gibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit $p(\text{Hit})$ ist, ein inhibitorisches „small molecule“ zu identifizieren. In dem zellbasierten Testsystem mit der Indikatorzelllinie JV06, sollte, ab einer Verminderung des Signals um 37%, die Wahrscheinlichkeit einen Hit zu haben, 100% entsprechen. Um die Anzahl der Kandidaten zu minimieren und nur die wirksamsten Moleküle im Weiteren zu untersuchen, wurde die Grenze für potentielle Inhibitoren auf eine Reduktion von mindestens 50% des maximalen Signals festgelegt. 16 der 160 „small molecules“ haben erstens die Verringerung des GFP-Fluoreszenzsignals um 50% oder mehr bewirkt und zweitens keinen toxischen Effekt auf die Zellen. Sie sind in Abbildung 32 durch den rot begrenzten Bereich gekennzeichnet.

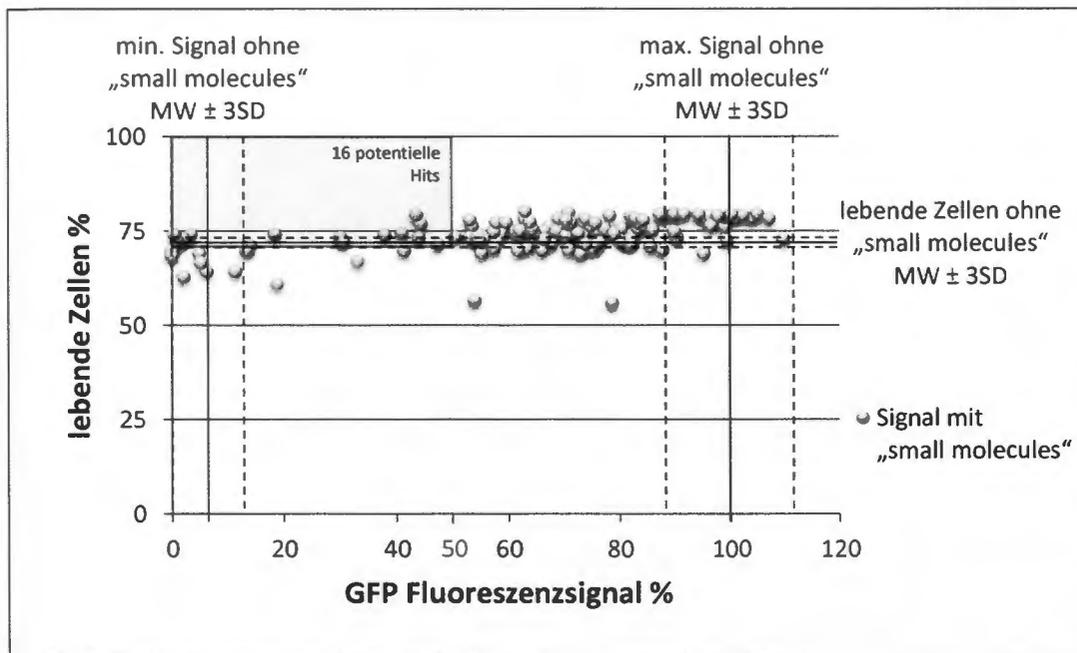


Abbildung 32: „Small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC mit dem zellbasierten Testsystem

7,5x10⁴ Zellen wurden pro Kultur in 96-Loch-Platten ausgesät und die „small molecules“ in einer Endkonzentration von 5 µM hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen mit Östrogen in einer Endkonzentration von 10 nM induziert und nun für 16 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Messung des Anteils der lebenden Zellen und der Fluoreszenzintensität von GFP in den lebenden Zellen mit dem Durchflusszytometer BD LSR-II™. Die Mittelwerte von drei Referenzkulturen sind als vertikale, durchgehende Linien sowohl für das minimale als auch das maximale Signal in Blau dargestellt. Der Mittelwert für den Anteil der lebenden Zellen wurde aus drei Referenzkulturen ermittelt und ist als grüne, durchgehende, horizontale Linie dargestellt. Die Toleranzbereiche der Mittelwerte werden durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichungen (± 3SD) definiert und von unterbrochenen Linien begrenzt. Für jeden Naturstoff sind die Werte der GFP-Fluoreszenzintensität in Prozent des maximalen Signals gegen den Anteil der lebenden Zellen aufgetragen und als gelbe Punkte dargestellt. „Small molecules“, welche die Viabilität der Zellen nicht beeinflussen, aber die GFP-Fluoreszenzintensität um mindestens 50% reduziert haben, sind durch den rot begrenzten Bereich markiert.

Die Namen der „small molecules“, die sich in dem rot begrenzten Bereich befinden sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

„small molecule“	Organismus	Quelle	funktionelle Gruppe
Gephyronic acid	<i>Archangium gephyra</i>	(Sasse, Steinmetz, Hofle & Reichenbach, 1995)	A
Vioprolid A	<i>Cystobacter violaceus</i>	(Schummer et al., 1996); Patent # 20100028298	
Vioprolid B			
Vioprolid C			
Vioprolid D			
Chondramid A	<i>Chondromyces crocatus</i>	(Kunze, Jansen, Sasse, Hofle & Reichenbach, 1995)	B
Chondramid B			
Chondramid C			
Chondramid D			
Chivosazol A	<i>Sorangium cellulosum</i>	(Diestel et al., 2009; Irschik, Jansen, Gerth, Hofle & Reichenbach, 1995)	
Rhizopodin	<i>Myxococcus stipitatus</i>	(Hagelueken et al., 2009; Sasse, Steinmetz, Hofle & Reichenbach, 1993)	
Cruentaren A	<i>Byssovorax cruenta</i>	(Kunze et al., 2006)	
Kulkenon	<i>Sorangium Cellulosum</i>	Jahresbericht HZI Braunschweig 2001	
Saframycin Mx1	<i>Myxococcus xanthus</i>	(Irschik, Trowitzsch-Kienast, Gerth, Hofle & Reichenbach, 1988)	
Tartrolon	<i>Sorangium Cellulosum</i>	(Irschik, Schummer, Gerth, Hofle & Reichenbach, 1995)	
Tubulysin A	<i>Archangium gephyra</i>	(Sasse, Steinmetz, Heil, Hofle & Reichenbach, 2000; Steinmetz et al., 2004)	

Tabelle 21: Potentielle „small molecule“-Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2

Die „small molecules“ Gephyronic Acid (Sasse et al., 1995) sowie die Vioprolide A - D (Schummer et al., 1996) können zu einer funktionellen Gruppe zusammengefasst werden. Sie wirken zytostatisch auf Säugetierzellen und inhibieren die Proteinsynthese. Vioprolid A zeigt einen verstärkenden Einfluss auf den Interferon-Signalweg sowie einen antiviralen und antiproliferativen Effekt (Patent # 20100028298). Die Chondramide A-D (Kunze et al., 1995) sowie Chivosazol A (Diestel et al., 2009; Irschik et al., 1995a) und Rhizopodin A (Hagelueken et al., 2009; Sasse et al., 1993) können ebenfalls zu einer funktionellen Gruppe zusammengefasst werden. Sie alle beeinflussen die Polymerisation von Aktin. In Kapitel 5.6 (S. 140) der Diskussion wird die bisher bekannte Funktion dieser Moleküle genauer beschrieben. Die Auswirkungen der weiteren „small molecules“ lassen sich nicht in Gruppen zusammenfassen. Cruentaren A kann das Wachstum von Hefen und Pilzen inhibieren. Es hemmt die ATP-Hydrolyse in Mitochondrien

und interferiert mit der F_0F_1 -ATPase in der Mitochondrienmembran (Kunze et al., 2006). Kullkenon ist ein „small molecule“, von dem bisher nur die Struktur bekannt ist (Jahresbericht HZII, 2001). Saframycin Mx1 (Irschik et al., 1988) gehört zur Gruppe der Saframycine und ist ein starker Inhibitor des Wachstums Gram positiver Bakterien sowie von Tumorzelllinien. Die Wirkung von Saframycin beruht auf Modifikationen der DNA, die dazu führen, dass diese nicht mehr als Template zur DNA- und RNA-Synthese verwendet werden kann. Tartrolon (Irschik, Schummer, et al., 1995) hemmt die RNA-, DNA- und Protein-Synthese Gram positiver Bakterien und Säugetierzellen. Der Wirkungsmechanismus ist allerdings unbekannt. Tubulylin A (Sasse et al., 2000; Steinmetz et al., 2004) wurde bisher als starker Inhibitor der Polymerisation von Mikrotubuli beschrieben.

4.6.2 Bestätigung und Kontrolle der Wirkung von „small molecules“ aus der Naturstoffbank NHC mit der Indikatorzelllinie JV06 und der Kontrollzelllinie MR31.6

Der zellbasierte „small molecule screen“ der Naturstoffbank NHC identifizierte 16 unterschiedliche Substanzen, die in der Lage waren, die GFP-Expression zu verringern, ohne die Viabilität der Suspensionszellen während der Dauer des Versuches zu beeinflussen. Nun sollte überprüft werden, ob die in Tabelle 21 gelisteten „small molecules“ auch in einem zweiten Test, die EBNA2-abhängige Transaktivierung des GFP-Proteins in der Indikatorzelllinie JV06 inhibieren. Parallel sollte in einem Sekundärtest überprüft werden, ob die GFP-Expression in der Kontrollzelllinie MR31.6 beeinflusst wird. In dieser Zelllinie steht das GFP-Protein unter der Kontrolle eines von Doxyzyklin abhängigen Promotors und ist somit EBNA2-unabhängig.

Sowohl die Bestätigung der Wirkung der Naturstoffe mit der Indikatorzelllinie als auch der Sekundärtest mit der Kontrollzelllinie MR31.6 wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Es wurden jeweils $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur von beiden Zelllinien in 96-Loch-Platten ausgesät. Die 16 unterschiedlichen „small molecules“ wurden in Endkonzentrationen von 1,25 μM , 2,5 μM und 5 μM dazu gegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Kulturen der Indikatorzelllinie JV06 mit Östrogen in einer Endkonzentration von 10 nM und die Kulturen der Kontrollzelllinie MR31.6 mit Doxyzyklin in einer Konzentration von 2,5 ng/ml induziert und weitere 16 h kultiviert. Die Messung des Anteils der lebenden Zellen und der GFP-Fluoreszenz in den lebenden Zellen erfolgte im Anschluss an die Inkubation mittels des BD FACSCalibur™. In Abbildung 33 sind die Mittelwerte (MW) für das maximale und minimale Signal der GFP-Fluoreszenz ohne die Zugabe von „small molecules“ von drei Referenzkulturen als durchgehende

blaue Linien dargestellt. Der Mittelwert (MW) für den Anteil der lebenden Zellen ohne die Zugabe von „small molecules“ wurde aus drei Referenzkulturen ermittelt und ist als grüne horizontale Linie dargestellt. Die Toleranzbereiche, die durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung entstehen ($\pm 3SD$), werden durch unterbrochene Linien begrenzt. Die Wirkung der „small molecules“ wurde für jede Konzentration nur einmal bestimmt, da keine ausreichenden Mengen der Naturstoffe für mehrfache Messungen zur Verfügung standen. Die Einzelwerte nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen wurden für jeden Naturstoff als grüne Balken für den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz und als blaue Punkte für den Anteil der lebenden Zellen aufgetragen. Abbildung 33 A zeigt die „small molecules“ aus Gruppe A, welche die Translation beeinflussen. Bei diesen Molekülen konnte bestätigt werden, dass sie die Expression von GFP in der Indikatorzelllinie vollständig inhibieren und keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben. Die Naturstoffe Cruentaren A und Tubulylin A, die in dieser Abbildung dargestellt sind, haben die EBNA2-abhängige GFP-Expression erneut gehemmt. Die Inhibition war allerdings deutlich geringer als im primären „small molecule screen“ und nicht abhängig von der Konzentration der Naturstoffe. Die Viabilität der Suspensionszellen wurde von diesen Molekülen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht beeinflusst. Die „small molecules“ Saframycin und Tartrolon konnten die EBNA2-abhängige GFP-Expression konzentrationsabhängig hemmen. Allerdings sinkt durch die Zugabe von steigenden Konzentrationen Tartrolon auch der Anteil der lebenden Zellen.

In Abbildung 33 B ist der Einfluss der bisher in ihrer Wirkung bestätigten „small molecules“ auf die Kontrollzelllinie MR31.6 dargestellt. „Small molecules“ aus Gruppe A, welche die Translation beeinflussen, verursachen auch in der Kontrollzelllinie die vollständige Inhibition der GFP-Expression. Die Viabilität der Suspensionszellen wird unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht beeinflusst. Da die GFP-Expression in der Kontrollzelllinie EBNA2-unabhängig ist, scheiden die Naturstoffe aus Gruppe A als potentielle Inhibitoren der CBF1-vermittelten Transaktivierung durch EBNA2 aus. Auch die „small molecules“ Cruentaren A, Saframycin, Tartrolon und Tubulylin A inhibieren die EBNA2-unabhängige GFP-Expression und sind folglich keine spezifischen Inhibitoren. Zudem zeigen Saframycin und Tartrolon in der Kontrollzelllinie einen negativen, konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Viabilität der Zellen.

Abbildung 33 C zeigt Auswirkung der Naturstoffe aus Gruppe B, welche die Aktinpolymerisation beeinflussen und Kulkenon, dessen biologische Aktivität bisher noch nicht beschrieben wurde. Diese „small molecules“ hemmen die GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration. Chondramid D und Kulkenon haben in der Indikatorzelllinie JV06 in der Konzentration von 5 μ M einen geringen Einfluss auf die Viabilität.

Die Moleküle aus Gruppe B und Kulkenon wurden auch in der Kontrollzelllinie MR31.6 überprüft. Ihr Einfluss auf den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz und den Anteil der lebenden Zellen ist in Abbildung 33 D dargestellt. Sie haben im Vergleich zu der EBNA2-abhängigen GFP-Expression in der Indikatorzelllinie einen deutlich geringeren Einfluss auf die EBNA2-unabhängige GFP-Expression in der Kontrollzelllinie MR31.6. Deshalb kommen sie weiterhin als potentielle Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2 in Frage. Allerdings sollte beachtet werden, dass der Naturstoff Chivosazol A einen deutlichen Effekt auf die Viabilität der Kontrollzelllinie hat.

Abbildung 33: Bestätigung und Kontrolle der inhibitorischen Wirkung von „small molecules“ aus der Naturstoffbank NHC in der Indikatorzelllinie JV06 und der Kontrollzelllinie MR31.6 (folgende Seiten)

Naturstoffe die im ersten „small molecule screen“ eine Inhibition der GFP-Expression von mind. 50% bewirkt haben, wurden erneut mit der Indikatorzelllinie JV06 auf ihre inhibitorischen Eigenschaften überprüft (**A & C**). Parallel wurde die Auswirkung der Naturstoffe in der Kontrollzelllinie MR31.6 untersucht, in der die GFP-Expression durch das EBNA2 unabhängige Tet Repressor System reguliert wird (**B & D**). Von beiden Zelllinien wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur in 96-Loch-Platten ausgesät und die „small molecules“ in Endkonzentrationen von 1,25 μM , 2,5 μM und 5 μM dazu gegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 10 nM Östrogen (Indikatorzelllinie) bzw. 2,5 ng/ml Doxyzyklin (Kontrollzelllinie) induziert und für weitere 16 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Messung des Anteils der lebenden Zellen und der Fluoreszenzintensität von GFP der lebenden Zellen mit dem FACS BD LSR-II™. Die Mittelwerte (MW) wurden als durchgehende Linien für das maximale und minimale Signal der GFP-Fluoreszenz in Grün und den Anteil der lebenden Zellen in Blau dargestellt. Die Toleranzbereiche der Mittelwerte werden durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichungen ($\pm 3\text{SD}$) definiert und von unterbrochenen Linien begrenzt. Die gemessenen Einzelwerte für jeden Naturstoff sind als grüne Balken für den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz und als blaue Punkte für den Anteil der lebenden Zellen aufgetragen. Einige Naturstoffe können aufgrund ihrer Funktion in Gruppen zusammengefasst werden, die in Tabelle 21 gelistet sind. (**A**) und (**B**) zeigen Naturstoffe, die sowohl in der EBNA2-abhängigen Indikatorzelllinie JV06 die GFP-Expression hemmen (**A**), als auch in der EBNA2 unabhängigen Kontrollzelllinie MR31.6 eine inhibitorische Wirkung zeigen (**B**) und somit unspezifisch sind. (**C**) und (**D**) zeigen die Wirkung von Naturstoffen, welche nur die EBNA2-abhängige GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 (**C**), aber nicht die EBNA2 unabhängige GFP-Expression in der Kontrollzelllinie MR31.6 (**D**) inhibieren. Diese „small

molecules“ sind daher weiterhin potentielle Hemmstoffe der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2.

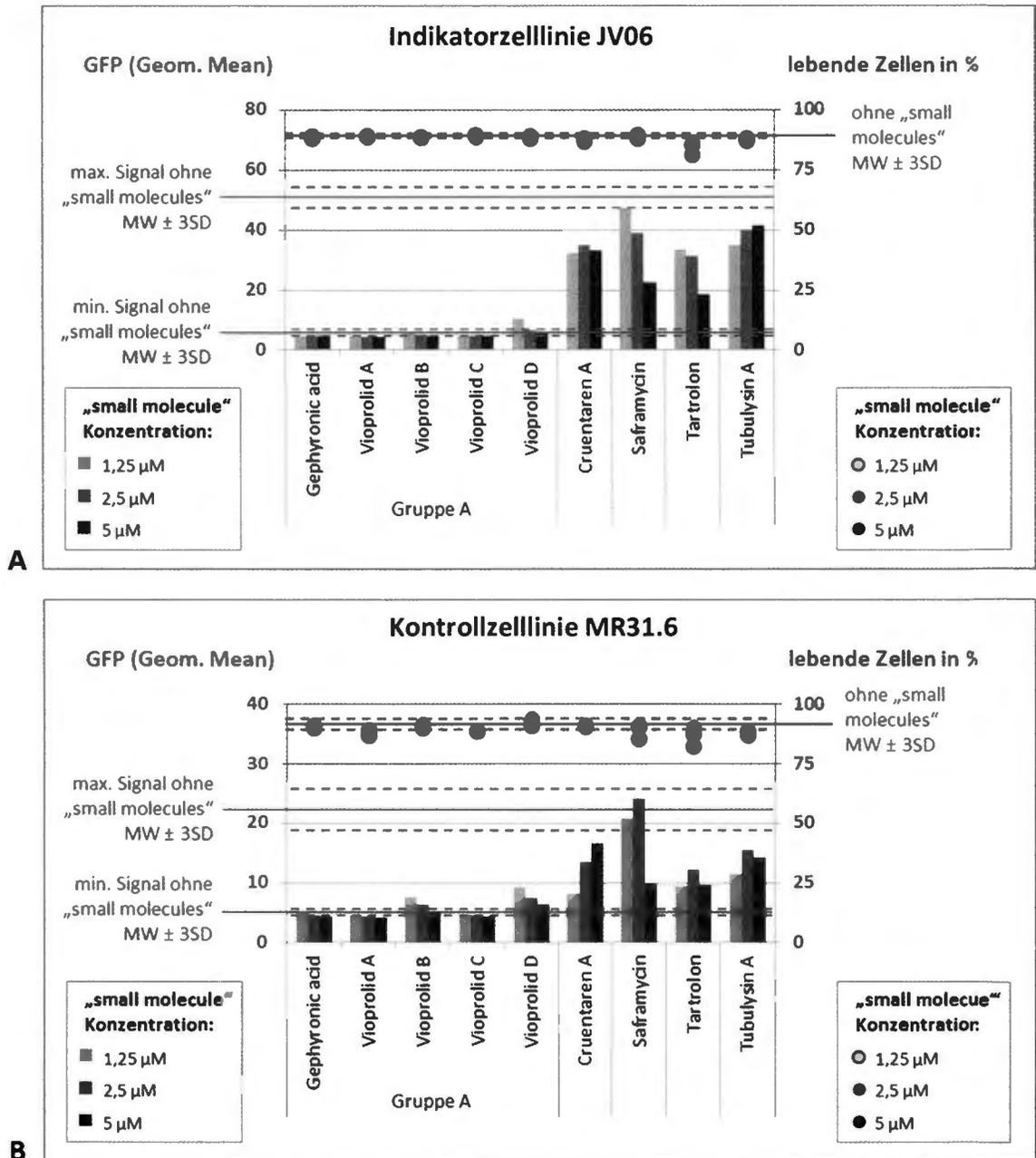


Abbildung 33: Bestätigung und Kontrolle der inhibitorischen Wirkung von „small molecules“ aus der Naturstoffbank NHC in der Indikatorzelllinie JV06 und der Kontrollzelllinie MR31.6

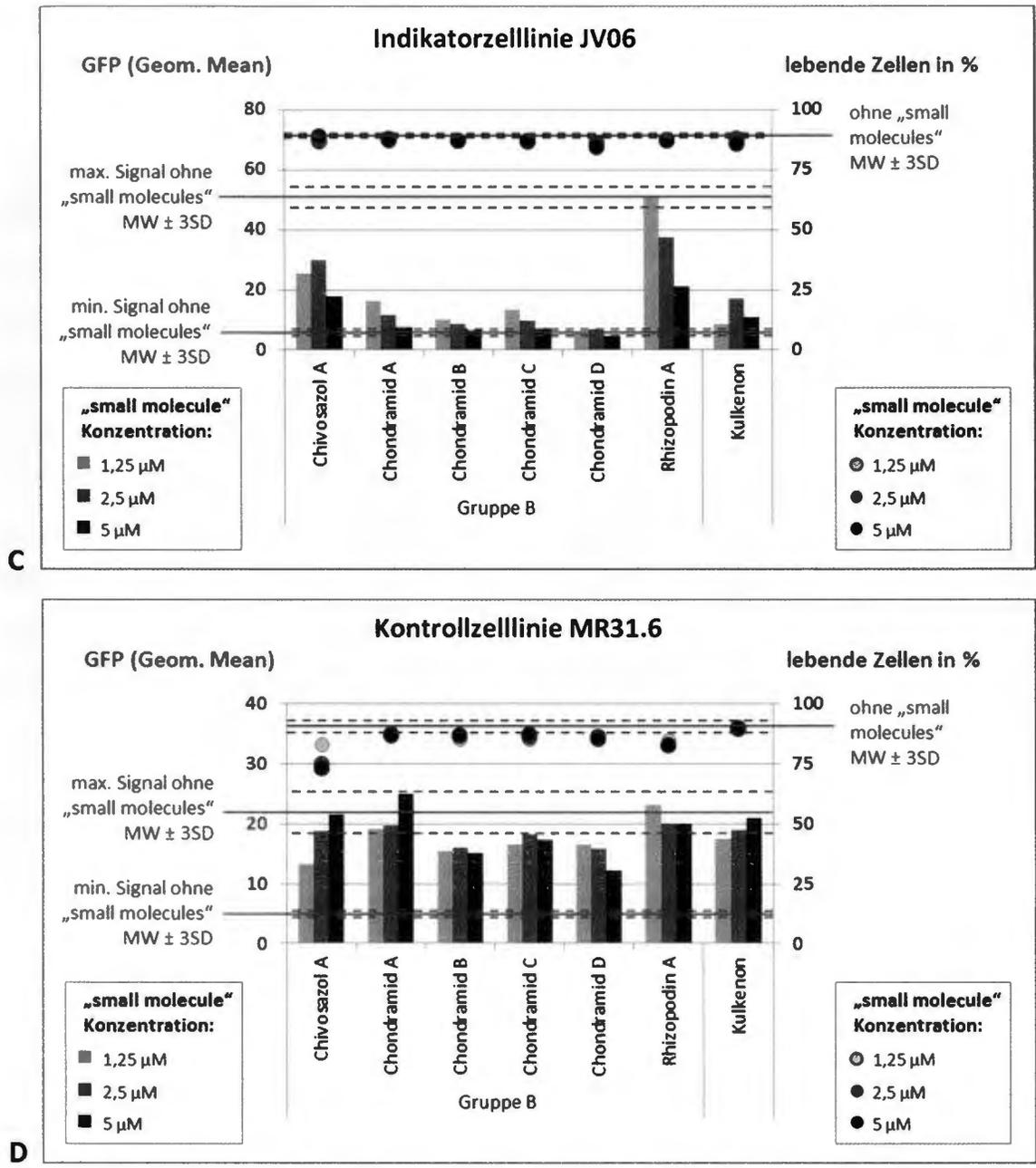


Abbildung 33: Bestätigung und Kontrolle der inhibitorischen Wirkung von „small molecules“ aus der Naturstoffbank NHC in der Indikatorzelllinie JV06 und der Kontrollzelllinie MR31.6

Die inhibitorische Wirkung der Naturstoffe Chivosazol A, Chondramid D und Kulkenon wurde nochmals in drei unabhängigen Experimenten überprüft. Die Hemmung der GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 konnte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem haben die Substanzen erneut keinen (Kulkenon), bzw. nur einen geringen Effekt (Chivosazol A und Chondramid D) auf die Kontrollzelllinie MR31.6 gezeigt. Rhizopodin A und die Chondramide A bis

C konnten bisher nicht erneut überprüft werden, da keine ausreichenden Mengen dieser Substanzen zur Verfügung standen.

4.6.3 Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktinpolymerisation, hemmt die ER/EBNA2-Funktion nicht

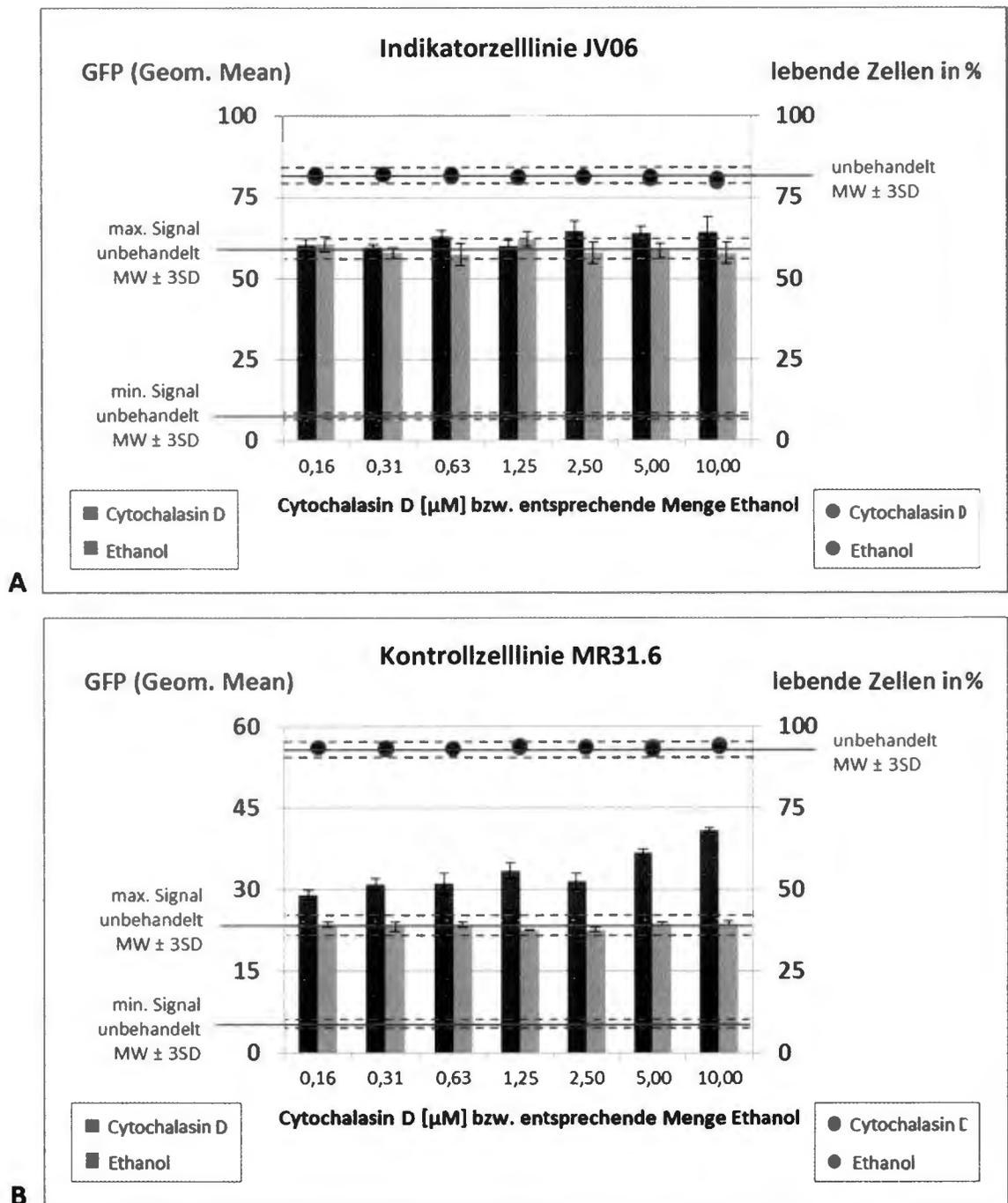
Mit Hilfe der Kontrollzelllinie MR31.6 konnten die Gruppe der „small molecules“, die zuvor als Translationsinhibitoren beschrieben worden waren, sowie vier weitere Moleküle als potentielle Hemmstoffe der EBNA2-abhängigen Transaktivierung ausgeschlossen werden. Die Gruppe der Naturstoffe, welche die Aktinpolymerisation beeinflussen, und Kulkenon sind jedoch weiterhin potentielle Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2. Um zu überprüfen, ob die GFP-Expression in dem zellbasierten Testsystem tatsächlich von der Aktinpolymerisation abhängig ist, wurde Cytochalasin D, ein Hemmstoff der Aktinpolymerisation (Casella, Flanagan & Lin, 1981), verwendet. Dies ist eine Substanz, die zum einen an Aktinfilamente bindet und so deren Polymerisation verhindert und andererseits zu einer zellulären Antwort führt, die mit der Spaltung bestehender Aktinfilamente einhergeht (Schliwa, 1982). Die Abhängigkeit der GFP-Expression von der Aktinpolymerisation wurde sowohl in der Indikatorzelllinie JV06 als auch in der Kontrollzelllinie MR31.6 untersucht. Für dieses Experiment wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur von beiden Zelllinien in 96-Loch-Platten ausgesät. Cytochalasin D wurde in Endkonzentrationen von $0,16 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$ titriert und zu den Kulturen gegeben. Außerdem wurde als Kontrolle auch der Einfluss von Ethanol (EtOH), welches als Lösungsmittel für Cytochalasin D dient, untersucht. Dafür wurde zu den Kulturen eine, den unterschiedlichen Cytochalasin D Konzentrationen entsprechende Menge EtOH, gegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Kulturen der Indikatorzelllinie JV06 mit Östrogen in einer Endkonzentration von 10 nM und die Kulturen von der Kontrollzelllinie MR31.6 mit Doxyzyklin in einer Konzentration von $2,5 \text{ ng/ml}$ induziert und weitere 16 h kultiviert. Außerdem wurden erneut Referenzkulturen angelegt, welche das maximale und minimale GFP-Fluoreszenzsignal ohne die Behandlung mit Cytochalasin D oder Lösungsmittel repräsentieren. Die Messung der GFP-Fluoreszenz und des Anteils der lebenden Zellen erfolgte im Anschluss an die Inkubation mittels des BD FACSCalibur™. In Abbildung 34 sind die Mittelwerte (MW) von jeweils drei unbehandelten Referenzkulturen für das maximale und minimale GFP-Fluoreszenzsignal (grün, durchgehende Linie) und den Anteil der lebenden Zellen (blau, durchgehende Linie) dargestellt. Der Toleranzbereich entsteht durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichung ($\pm 3\text{SD}$) und wird für jeden Mittelwert durch unterbrochene Linien begrenzt. Die Mittelwerte mit

Standardabweichung von drei Einzelwerten nach Zugabe von Cytochalasin D oder des Lösungsmittels Ethanol sind für den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz als grüne Balken und für den Anteil der Lebenden Zellen als blaue Punkte dargestellt. In Abbildung 34 A ist die Indikatorzelllinie JV06 dargestellt. Die Viabilität der Indikatorzelllinie wird durch das Lösungsmittel Ethanol oder durch Cytochalasin D nur durch Einsatz der höchsten Konzentrationen sehr gering beeinflusst. Die GFP-Expression wird durch die Zugabe von steigenden Mengen Ethanol nicht verändert. Steigende Konzentrationen von Cytochalasin D führen zu einem leichten Anstieg der GFP-Fluoreszenz. Abbildung 34B zeigt die Kontrollzelllinie MR31.6. Die Viabilität dieser Zelllinie wird ebenfalls nicht durch Ethanol oder Cytochalasin D beeinflusst. Die Zugabe von unterschiedlichen Mengen Ethanol bedingt keine Änderung der GFP-Fluoreszenz. Allerdings ist ein deutlicher Anstieg der GFP-Fluoreszenz durch steigende Konzentrationen von Cytochalasin D zu beobachten.

Abbildung 34: Einfluss des Aktininhibitors Cytochalasin D auf die GFP-Expression in der Indikatorzelllinie und der Kontrollzelllinie (folgende Seite)

Von beiden Zelllinien wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur in 96-Loch-Platten ausgesät und Cytochalasin D in Endkonzentrationen von $0,16 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$ oder Ethanol in den korrespondierenden Mengen dazu gegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 10 nM Östrogen (Indikatorzelllinie) bzw. $2,5 \text{ ng/ml}$ Doxyzyklin (Kontrollzelllinie) induziert und für 16 h kultiviert. Referenzkulturen für den maximalen und minimalen Wert der GFP-Fluoreszenz wurden ebenfalls angelegt. Anschließend erfolgte die Messung des Anteils der lebenden Zellen und der Fluoreszenzintensität von GFP der lebenden Zellen mit dem FACS BD LSR-II™. Die Mittelwerte (MW) wurden als durchgehende Linien für das maximale und minimale Signal der GFP-Fluoreszenz in Grün und den Anteil der lebenden Zellen in Blau dargestellt. Die Toleranzbereiche der Mittelwerte werden durch Addition und Subtraktion der 3-fachen Standardabweichungen ($\pm 3\text{SD}$) definiert und von unterbrochenen Linien begrenzt. Die Mittelwerte mit Standardabweichung für den Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz sind als grüne Balken und als blaue Punkte für den Anteil der lebenden Zellen gegen die verwendeten Konzentrationen von Cytochalasin D oder Ethanol (EtOH) aufgetragen. **(A)** zeigt den Einfluss von Cytochalasin D und EtOH auf die Indikatorzelllinie JV06. EtOH hat keine Auswirkung auf die GFP-Fluoreszenz. Cytochalasin D führt zu einem leichten Anstieg der GFP-Fluoreszenz. Die Viabilität der Zellen wird bei der höchsten Konzentration des Lösungsmittels gering beeinflusst. In **(B)** ist die Kontrollzelllinie MR31.6 dargestellt. Hier haben weder Cytochalasin D noch EtOH einen negativen Effekt auf die Viabilität der Zellen. Die Zugabe von EtOH verändert das Fluoreszenzsignal von GFP nicht. Ansteigende

Konzentrationen an Cytochalasin D führen zu einem deutlichen Anstieg der Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz.



Der Aktininhibitor Cytochalasin D und auch das Lösungsmittel EtOH haben keinen negativen Einfluss auf die GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 oder der Zelllinie MR31.6 Die Verminderung des Geom. Mean der GFP-Fluoreszenz durch Naturstoffe beruht folglich nicht auf der Beeinflussung der Aktinpolymerisation. Die Moleküle Chondramid A bis D, Chivosazol A und

Rhizopodin A bleiben daher weiterhin potentielle Kandidaten für die Inhibition der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2. Eine genaue Beschreibung dieser „small molecules“ erfolgt in Kapitel 5.6 (S. 140).

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Testsysteme zu entwickeln, die es ermöglichen, Inhibitoren für die Notch- oder EBNA2-vermittelte Transaktivierung von Zielgenen zu identifizieren. Es wurde beschlossen, ein biochemisches und ein zellbasiertes Testsystem zu entwickeln. Für die Wahl der Zielstruktur, sowohl im biochemischen als auch im zellbasierten Testsystem, mussten drei Kriterien beachtet werden. Erstens sollte die Zielstruktur maßgeblich an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein. Zweitens sollte sie der Anforderung der „chemical tractability“ entsprechen, was bedeutet, dass es möglich sein sollte, die Zielstruktur mit chemischen Substanzen aus einer möglichst variablen „small molecule“-Bank zu hemmen. Drittens sollte es möglich sein, die Inhibition der Zielstruktur durch Hochdurchsatzverfahren zu detektieren (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011). Im Folgenden wird zunächst dargestellt, dass die für diese Arbeit gewählten Zielstrukturen diesen drei Ansprüchen genügen. Anschließend werden die Ergebnisse des HTS der „small molecule“-Banken mit beiden Testsystemen zusammengefasst. Schließlich werden potentielle Inhibitoren genauer beschrieben und mögliche Wirkmechanismen der Inhibition diskutiert.

5.1 Sind die CBF1/Notch- und die CBF1/EBNA2-Interaktion bei der Entstehung von Krankheiten von Bedeutung?

Der kanonische Notch-Signalweg ist für die Regulation von Proliferation, Apoptose und Differenzierung notwendig. Daher ist er sowohl während der Entwicklung von Organismen als auch für den Erhalt von Geweben von großer Bedeutung (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Die Fehlregulation dieses Signalwegs führt allerdings zu akuten Erkrankungen. In 50% der T-ALL und auch in soliden Tumoren wurden Mutationen des Notch-Signalweges nachgewiesen (Übersicht: Wang, Z. et al., 2010; Weng et al., 2004).

Die EBV-Infektion führt *in vitro* zu unbegrenzt proliferierenden LCLs, die das Transkriptionsprogramm der Latenz III exprimieren (Siemer et al., 2008). *In vivo* wird nach der Primärinfektion durch EBV die persistierende latente Infektion etabliert, die bei immunsupprimierten Patienten zu PTLD oder PCNSL führen kann (Übersicht: Kutok & Wang, 2006). Auch in diesen Erkrankungen werden die Transkripte der Latenz III exprimiert. Für diese Latenzphase sind neun latente Proteine charakteristisch, deren Transkription durch das virale Protein EBNA2 reguliert wird.

Sowohl EBNA2 als auch Notch sind für die Regulation ihrer Zielgene auf die Bindung an CBF1 angewiesen (Übersicht: Hayward, Liu & Fujimuro, 2006). Diese Interaktion erfolgt sowohl bei Notch als auch EBNA2 über ein WxP-Motiv mit der hydrophoben Bindetasche von CBF1 (Johnson et al., 2010).

5.2 Haben die CBF1/Notch- und die CBF1/EBNA2-Interaktion ähnliche Eigenschaften wie bereits erfolgreich gehemmte Zielstrukturen?

Eine Zielstruktur sollte die Anforderung der „chemical tractability“ erfüllen. Das bedeutet, dass es möglich sein sollte, die Zielstruktur mit chemischen Substanzen aus einer möglichst variablen „small molecule“-Bank zu hemmen (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011). Allerdings ist die „chemical tractability“ nicht alleine von der Zielstruktur abhängig, sondern auch von der Wahl der „small molecule“-Bank. Im Folgenden wird beschrieben, welche Eigenschaften bereits erfolgreich gehemmte Zielstrukturen aufweisen und wie die CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion, welche für diese Arbeit als Zielstrukturen gewählt wurden, im Vergleich dazu aussehen.

5.2.1 Charakteristika von Zielstrukturen, die in den Anfängen der HTS-Industrie als geeignet galten

Zu Beginn der HTS-Industrie, wurde vor allem nach Inhibitoren von Enzymen, Kinasen, Hormonrezeptoren, Ionenkanälen und GPCRs („G-protein coupled receptors“) gesucht (Übersicht: Buchwald, 2010). Diese Proteine interagieren mit ihren Liganden durch kleine Bindetaschen, die im Durchschnitt ein Volumen von ca. 610 \AA^3 aufweisen (An, J., Totrov & Abagyan, 2005). Ein Beispiel ist die Identifizierung eines Inhibitors der Kinase JAK3. Diese Kinase gehört zu einer Untergruppe der Tyrosin-Kinasen, die an Wachstum, Überleben, Entwicklung und Differenzierung in einer Vielzahl von Zellen, aber vor allem in Zellen des Immunsystems und hämatopoetischen Zellen, von großer Bedeutung sind. Aktivierende Mutationen von JAK-Kinasen führen zu malignen Transformationen (Übersicht: Ghoreschi, Laurence & O'Shea, 2009). Das aktive Zentrum dieser Kinasen, das aus einer Tasche mit einer Größe von ca. 530 \AA^3 besteht (Sudbeck et al., 1999), bindet Purine, die als Quelle für γ Phosphat dienen, das auf Substratproteine übertragen wird (Übersicht: Ghoreschi et al., 2009). Bereits 1996 wurde ein

„screen“ der Pfizer „small molecule“-Bank, mit über 400000 chemischen Substanzen durchgeführt, um ein Molekül zu identifizieren, das sich für die Inhibition der Kinase JAK3 eignet. Dieser „screen“ führte zunächst zu der Leitsubstanz CP-352,664, die eine halbmaximale Wirksamkeit (IC_{50}) bei einer Konzentration von 210 nM bei der Inhibition von JAK3 aufgewiesen hat. Allerdings beeinflusste diese Leitsubstanz auch die Kinasen JAK1 und JAK2 und hatte eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten in humanen Zellen. Durch mehrfache Modifikationen der Leitsubstanz gelang es, das Molekül CP-690,550 zu identifizieren, das ein Molekulargewicht von 312,37 Da hat und auch die weiteren „Lipinski rule of five“ erfüllt (Flanagan et al., 2010). Kristallstrukturen haben gezeigt, dass dieses „small molecule“ ca. die Hälfte der Bindetasche von JAK3 bedeckt (Chrencik et al., 2010). In biochemischen Tests wurde nachgewiesen, dass die Hemmung der Proteinkinase JAK3 nun mit einer inhibitorischen halbmaximalen Konzentration (IC_{50}) von 1 nM erfolgt. Allerdings besteht auch weiterhin die Affinität zu JAK1 ($IC_{50} = 3,2$ nM) und JAK2 ($IC_{50} = 4,1$ nM). In zellbasierten Assays bindet das Molekül CP-690,550 jedoch mit einer Affinität von ca. 11 nM an JAK1 und JAK3 und mit einer Affinität von 324 nM an JAK2. Das ermöglicht eine differentielle Inhibition (Flanagan et al., 2010).

5.2.2 Charakteristika der hemmbaren Protein/Protein-Interaktion (PPI) von MDM2 und p53

Im Vergleich zu enzymatischen Reaktionen galten PPIs als schlechte Zielstrukturen, da man glaubte, dass Proteininteraktionen nur durch große Proteinoberflächen von 1500 bis 3000 Å² vermittelt werden (Übersicht: Buchwald, 2010). Zu Beginn der HTS-Industrie erfolgte die Archivierung der „small molecule“-Banken nach Kriterien, welche für die Identifizierung von Inhibitoren von aktiven Zentren und Bindetaschen und nicht von großen Proteinoberflächen notwendig waren (Kapitel 1.5, S. 18). Es wurde jedoch gezeigt, dass PPIs auf „hot spots“ basieren, die aus Bindetaschen mit einem Mosaik aus hydrophoben und polaren Regionen bestehen, so dass die Inhibition der Bindung von wenigen Aminosäuren zur Hemmung der gesamten PPI führen kann (Kozakov et al., 2011). Bisher wurde beschrieben, dass ca. 30% der bekannten PPIs „hot spots“ beinhalten, die mit chemischen Substanzen aus den vorhandenen „small molecule“-Banken inhibiert werden können (Übersicht: Hajduk et al., 2005). Mittlerweile wurden auch einige potente Inhibitoren von Protein/Protein-Interaktionen identifiziert. Als Beispiel dafür dient die Interaktion von MDM2 und p53. Diese PPI basiert nicht auf der Interaktion von großen Proteinoberflächen, sondern auf der Bindung von drei Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Leucin) einer α -Helix, innerhalb von p53, an eine tiefe,

hydrophobe Binefurche (25Å lang, bis zu 10Å breit und max. 10Å tief) innerhalb von MDM2. Diese Interaktion hat eine apparente Dissoziationskonstante (K_d) von ca. 1 μM (Kussie et al., 1996). Seit der Veröffentlichung der Kristallstruktur der MDM2/p53-Interaktion sind mehrere unterschiedliche Strategien verfolgt worden, um Inhibitoren dieser PPI zu identifizieren. Die bisher erfolgreichste Herangehensweise war ein „small molecule screen“ im Hochdurchsatzverfahren, der von Vassilev und Kollegen in der Firma Roche durchgeführt wurde. Dabei wurden zunächst mehrere Substanzklassen als Leitstrukturen identifiziert und im Weiteren hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Spezifität optimiert. Eine dieser Substanzklassen wurde als Nutline bezeichnet. Diese „small molecules“ konnten die Interaktion von MDM2 und p53 mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) in einem Bereich von 100-300 nM hemmen (Vassilev et al., 2004). Die Bindung der Nutline imitiert dabei die Bindung der drei Aminosäuren von p53 (Shin, J. S. et al., 2012) und besetzt drei kleine, hydrophobe Bindetaschen innerhalb der Binefurche von MDM2. Diese Bindetaschen, die ein Volumen von 186, 132 und 123 Å³ haben, stellen die „hot spots“ dieser Interaktion dar (Fuller, Burgoyne & Jackson, 2009). Nutlin-3a zeigt, mit einer IC_{50} von 90nM, die stärksten inhibitorischen Eigenschaften für die MDM2/p53-Interaktion (Vassilev et al., 2004). Dieses „small molecule“ induziert *ex vivo* die p53-abhängige Apoptose in einer Vielzahl von Lymphomen wie AML („akute myeloid leukaemia“), B-CLL („B-cell chronic lymphocytic leukaemia“), HL (Hodgkin Lymphom), MCL („mantle cell lymphoma“), KSHV-assoziierten Lymphomen und ALL (akute lymphoblastische Leukämie). Diese Wirksamkeit wird nun in klinischen Studien der Phase I auch in Zusammenhang mit weiteren Therapeutika untersucht (Saha, M. N., Micallef, Qiu & Chang, 2010).

5.2.3 Charakteristika der für diese Arbeit gewählten Protein/Protein Interaktionen

Für diese Arbeit wurde die Interaktion von CBF1 mit Notch oder CBF1 mit EBNA2 als Zielstruktur gewählt. Durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur von CBF1 wurde bekannt, dass CBF1 eine hydrophobe Bindetasche in der BTD („ β -trefoil domain“) ausbildet (Kovall & Hendrickson, 2004). Das Programm „Q-SiteFinder“ der Universität Leeds (Fuller et al., 2009, www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder) ermöglicht es, Bindetaschen, die mit „small molecules“ inhibiert werden können, zu identifizieren. Wendet man dieses Programm auf die Kristallstruktur von CBF1 an, wird die hydrophobe Bindetasche innerhalb der BTD von CBF1 als potentielle Zielstruktur für „small molecules“ erkannt. Diese Bindetasche hat ein Volumen von 115 Å³ (berechnet durch „Q-SiteFinder“) und ist für die Interaktion von CBF1 mit dem WxP-Motiv von

Notch oder EBNA2 notwendig (Johnson et al., 2010). Dieser Bindemechanismus entspricht der Interaktion von MDM2 mit p53, bei der ebenfalls wenige Aminosäuren, unter anderem auch ein Tryptophan, eines Interaktionspartners mit Bindetaschen mit kleinem Volumen des anderen Interaktionspartners interagieren. Sobald das WxP-Motiv von Notch oder EBNA2 nicht mehr vorhanden ist, findet auch keine Interaktion mit CBF1 statt (Johnson et al., 2010). Die Bindetasche von CBF1 und das WxP-Motiv von Notch oder EBNA2 stellen somit einen „hot spot“ dieser PPI dar. Um weitere „hot spots“ zu identifizieren, stehen seit kurzem auch online kostenlose Programme zur Verfügung. Ein Beispiel ist das Programm „HotPOINT“ der Koç Universität in Istanbul (Tuncbag, Keskin & Gursoy, 2010, <http://prism.cccb.ku.edu.tr/hotpoint/index.php>). Dieses Programm sagt die für die CBF1/EBNA2-Interaktion essentielle Aminosäure Glutamin (Q307) (Fuchs et al., 2001), die Bestandteil der hydrophoben Bindetasche von CBF1 ist, als „hot spot“ vorher. Die Mutation von Q307 führt zum Verlust der CBF1/EBNA2-Interaktion, so dass sie weder in „yeast-two-hybrid“- (Fuchs et al., 2001) noch in ITC-Experimenten (Johnson et al., 2010) nachgewiesen werden kann. Das Programm „HotPOINT“ definiert noch einen zweiten Bereich innerhalb von CBF1 als „hot spot“. Diese Region befindet sich außerhalb der hydrophoben Tasche und beinhaltet die Aminosäuren Phenylalanin (F235) und Lysin (K249), die nur für die CBF1/Notch-Interaktion essentiell sind (Fuchs et al., 2001). Vermutlich interagieren einige weitere konservierte Aminosäuren innerhalb von Notch, die sich N-Terminal des WxP-Motivs befinden, mit diesen Aminosäuren und verstärken so die Affinität dieser PPI. Denn CBF1 und Notch interagieren mit einer K_d von ca. 72 nM, während im Vergleich dazu die K_d der CBF1/EBNA2-Interaktion ca. 4,6 μ M beträgt. Mutationen von F235 und K249 führen zu deutlich geringeren Dissoziationskonstanten ($K_d > 10 \mu$ M) für die Interaktion von CBF1 und Notch (Johnson et al., 2010). Aufgrund dieser zwei „hot spots“ und der hydrophoben Bindetasche ist es möglich, die Interaktion von CBF1 mit Notch oder EBNA2 durch „small molecules“ zu inhibieren. Da für die CBF1/Notch und die CBF1/EBNA2-Interaktion unterschiedliche Aminosäuren von CBF1 essentiell sind, sollte es außerdem möglich sein, diese Interaktionen differentiell zu hemmen.

5.3 Kann die Inhibition der Zielstrukturen in HTS-Verfahren detektiert werden?

Das dritte Kriterium bei der Wahl einer Zielstruktur bildeten schließlich die technischen Möglichkeiten, die eingesetzt werden können, um PPIs im Hochdurchsatz nachzuweisen. Wie

bereits erwähnt, gibt es sowohl viele biochemische Methoden als auch einige zellbasierte Systeme, um PPIs darzustellen (Kapitel 1.5.3, S. 21).

5.3.1 Inhibition der Zielstruktur im biochemischen Testsystem

Ein biochemisches Testsystem ermöglicht es, die Wirkung einer chemischen Substanz auf die Interaktion der isolierten Interaktionspartner zu untersuchen. Das hat den Vorteil, dass nur „small molecules“, die einen direkten Einfluss auf die PPI haben, als potentielle Inhibitoren erkannt werden. Für das ELISA-basierte Testsystem war es notwendig, CBF1, Notch und EBNA2 rekombinant zu exprimieren und nativ aufzureinigen. Inhibitorische Effekte außerhalb der Zielstruktur, welche aus der BTD von CBF1 und dem WxP-Motiv von Notch oder EBNA2 besteht, wurden damit ausgeschlossen.

Wird die Interaktion von CBF1 mit weiteren viralen Proteinen durch einen potentiellen Inhibitor der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion beeinträchtigt?

Da CBF1 auch mit den EBV Proteinen EBNA3A und EBNA3C interagiert (Robertson et al., 1996), könnte man annehmen, dass ein potentieller Inhibitor der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion auch die Bindung der EBNA3-Proteine verhindert. Zhao publizierte 1996, dass die Bindung von EBNA3C an CBF1 über Aminosäuren der NTD und Teile der BTD erfolgt (Zhao, B., Marshall & Sample, 1996). Hinzu kommt, dass EBNA3C ebenfalls ein WxP-Motiv enthält. Allerdings wurde vor kurzem demonstriert, dass dieses Motiv nicht essentiell für die EBNA3C-Bindung an CBF1 ist (Calderwood et al., 2011). In Affinitätspräzipitationen konnte außerdem gezeigt werden, dass Mutationen der Aminosäuren F235, K249 oder Q307, welche für die Interaktion von Notch oder EBNA2 mit CBF1 essentiell sind, keine Auswirkung auf die Bindung von EBNA3C haben (nicht veröffentlichte Daten der AG Kempkes). Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass potentielle Inhibitoren der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion auch die Bindung von EBNA3C verhindern. Da die Interaktion der EBNA3-Proteine mit CBF1 auf eine homologe Domäne innerhalb dieser EBV Proteine zurückzuführen ist (Zhao B. et al., 1996), verhält sich die Bindung von EBNA3A an CBF1 vermutlich ähnlich zu der CBF1/EBNA3C Interaktion und wird auch nicht von potentiellen Notch oder EBNA2 Inhibitoren beeinflusst.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass das KSHV-Protein vIRF4, das ebenfalls ein WxP-Motiv enthält, durch einen Inhibitor der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion beeinflusst wird. Denn vIRF4 interagiert auch durch ein WxP-Motiv mit der hydrophoben Tasche von CBF1.

Werden die Aminosäuren Tryptophan und Prolin durch Alanine substituiert, findet keine Bindung an CBF1 mehr statt. Außerdem ist es möglich, die Bindung von CBF1 und Notch durch ein vIRF4 Peptid zu inhibieren (Heinzelmann et al., 2010). Folglich müssten die molekularen Wirkmechanismen eines potentiellen Inhibitors der CBF1/Notch- oder CBF1/EBNA2-Interaktion auch für die CBF1/vIRF4-Interaktion untersucht werden.

Das ELISA-basierte Testsystem für den Einsatz in HTS-Verfahren

Vor der Etablierung des ELISA-basierten Testsystems, wurde die biologische Aktivität des CBF1-Fragments und der GST-Fusionsproteine von Notch und EBNA2 überprüft. Zum einen konnte gezeigt werden, dass das His-CBF1-BTD-Fragment in der Lage ist Peptide zu binden, die das WxP-Motiv enthalten, das für die Bindung der Interaktionspartner notwendig ist (Kapitel 0, S. 69). Die biologische Aktivität der Notch und EBNA2 GST-Fusionsproteine wurde in Gel-Retardationsexperimenten überprüft. Hier konnte die Bindung von beiden Notch-Fragmenten an das Protein CBF1 nachgewiesen werden. Die Bindung der EBNA2-Fusionsproteine an CBF1 zeigt sich in diesen Experimenten deutlich schwächer als die Bindung von Notch an CBF1 (Kapitel 0, S. 71). Allerdings war es, aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen, die zur Verfügung standen, nicht möglich, eine größere molare Menge von GST-EBNA2-CR5+6 oder GST-EBNA2-CR6 einzusetzen. Der Nachweis dieser Interaktionen hätte eine größere Proteinmenge erfordert. Schließlich wurde die gegenseitige Bindung der rekombinanten Fragmente in Affinitätspräzipitationen überprüft (Kapitel 0, S. 74). Die Interaktion des Fragments His-CBF1-BTD mit beiden Notch-Fragmenten und mit dem GST-EBNA2-CR6 Protein konnte hier nachgewiesen werden. GST-EBNA2-CR5+6 wurde nicht von His-CBF1-BTD gebunden, obwohl von beiden Interaktionspartnern ausreichende Proteinmengen vorhanden waren. Die Bindeaffinitäten für die verschiedenen PPIs in den Gel-Retardationsexperimenten und den Affinitätspräzipitationen erscheinen unterschiedlich stark. Mit diesen Experimenten war es jedoch nicht möglich zu bestimmen, welcher Anteil der aufgereinigten Proteine biologisch aktiv ist. Eine Minderung der biologischen Aktivität des gesamten eingesetzten Proteins wird möglicherweise durch eine falsche Faltung des Proteins oder der Bindedomänen verursacht, welche durch die Analyse in denaturierenden Polyacrylamidgelen nicht erkannt werden.

Als nächstes wurde bestimmt, welche Proteinmengen der Interaktionspartner eingesetzt werden müssen, um ein Signal zu erhalten, das sich deutlich vom Hintergrund abhebt, aber nicht im gesättigten Bereich liegt, um später eine Inhibition zu ermöglichen (Kapitel 4.2.1, S. 77). Von GST-Notch-RAMANK wird deutlich weniger Protein benötigt als von GST-EBNA2-CR6, um das

gleiche Signal durch spezifische Interaktion mit His-CBF1-BTD oder durch unspezifische Bindung an die 96-Loch-Platte zu erhalten. Vergleicht man die effektiven Proteinkonzentrationen von Notch ($EC_{50} = 1,8 \text{ nM}$) und EBNA2 ($EC_{50} = 161 \text{ nM}$), die zu einem halbmaximalen Signal führen, so ist ca. 80-mal mehr GST-EBNA2-CR6 notwendig als GST-Notch-RAMANK, um das gleiche Signal zu erhalten. Das entspricht dem Verhältnis der apparenten Dissoziationskonstanten der CBF1/Notch- ($K_d = 72 \text{ nM}$) und CBF1/EBNA2- ($K_d = 4,6 \text{ }\mu\text{M}$) Interaktion (Johnson et al., 2010). Die Werte der effektiven Konzentration EC_{50} gelten allerdings nur für dieses Testsystem, da unbekannt ist, welche Menge His-CBF1-BTD an die Platte gebunden ist und welcher Anteil davon eine biologisch aktive Bindetasche präsentiert.

Um die Inhibition der spezifischen Interaktion zu ermöglichen, sollte das halbmaximale Signal der CBF1/Notch-Interaktion im HTS verwendet werden. Allerdings zeigt dieses Signal Schwankungen von mehr als 5% des maximalen Signals. Diese Varianz könnte die Identifizierung von potentiellen Inhibitoren erschweren, da nicht zwischen der spezifischen Inhibition und der Varianz unterschieden werden kann. Deshalb wurde beschlossen, eine Proteinkonzentration von GST-Notch-RAMANK einzusetzen, die zu einem deutlichen Signal mit geringer Varianz führt und weiterhin keine Sättigung der Bindung verursacht.

Das ELISA-basierte Testsystem eignet sich für den Einsatz als HTS-Verfahren

Die Menge der Proteinfragmente, welche aus einem Liter Bakterienkultur aufgereinigt werden können, ist für den Test von ca. 40000 Substanzen ausreichend, wenn diejenigen Proteinkonzentrationen verwendet werden, die durch Titration bestimmt wurden (Kapitel 4.2.1, S. 77). Die Bestimmung des Z'-Faktors und des Signal-Windows für die ELISA-basierten Testsysteme zur CBF1/Notch- und CBF1/EBNA2-Interaktion zeigte, dass sich die gewählten Reaktionsbedingungen für den Einsatz im HTS eignen (Kapitel 4.2.2, S. 83). Außerdem wird das Signal in beiden Testsystemen nicht durch DMSO, das als Lösungsmittel für „small molecules“ dient, beeinflusst (Kapitel 4.2.3, S. 90). Zudem ist es möglich, die spezifische Interaktion der Liganden mit Peptiden, die das WxP-Motiv enthalten, zu inhibieren (Kapitel 4.2.4, S. 91) und den Test sowohl im 96-Loch-Format als auch im 384-Loch-Format durchzuführen (Kapitel 4.2.5, S. 93). Die Inhibition durch ein Peptid scheint im 384-Loch-Format jedoch geringer zu sein, als im 96-Loch-Format (vgl. Abbildung 20 mit Abbildung 21 A, S. 92 und S. 94).

5.3.2 Inhibition der Zielstruktur im zellbasierten Testsystem

Das zellbasierte Testsystem ermöglicht es, die Auswirkungen von chemischen Substanzen auf die CBF1-abhängige Transaktivierung durch EBNA2 unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Die Zielstruktur ist nicht nur, wie im biochemischen Testsystem, die Interaktion von CBF1 und EBNA2, sondern der gesamte Prozess, welcher für die Aktivität von EBNA2-Zielgenen notwendig ist. Aus diesem Grund ist der molekulare Wirkmechanismus eines potentiellen Inhibitors zunächst unbekannt und muss in weiteren Experimenten ermittelt werden.

In dem zellbasierten Testsystem sollten die Effekte der chemischen Substanzen auf die EBNA2-abhängige Expression des Reportergens GFP untersucht werden. Um eine Inhibition zu ermöglichen, sollten die Experimente bei halbmaximaler Signalstärke von GFP durchgeführt werden. Damit bei jedem Experiment zuverlässig die halbmaximale Signalstärke von GFP verwendet werden konnte, war es notwendig, ein konditionales System zu etablieren. Dieses konditionale System basiert auf zwei Zelllinien: einer Indikatorzelllinie und einer Kontrollzelllinie. In der Indikatorzelllinie kann die EBNA2-abhängige Expression des Reportergens durch Zugabe von Östrogen induziert werden. In der Kontrollzelllinie wird die Expression des Reportergens GFP, EBNA2-unabhängig, durch die Zugabe von Doxzyklin induziert (Kapitel 4.4, S. 99).

Östrogenabhängige Prozesse könnten in dem zellbasierten Testsystem zur Zielstruktur werden

In der Indikatorzelllinie JV06 wird die modulare Funktion des Östrogenhormonrezeptors ausgenutzt, um die Expression des Reportergens GFP zu regulieren. Durch Fusion der Bindedomäne des Hormonrezeptors (ER) an EBNA2 kann die Lokalisation des viralen Proteins durch Östrogen reguliert werden. Ohne Östrogen sind „heat shock“ Proteine (HSP) wie HSP90 an das Fusionsprotein gebunden und verhindern die Translokation in den Nukleus. Nach Zugabe von Östrogen bindet das Hormon an das ER-Fragment, so dass das Fusionsprotein aus dem Komplex mit HSP90 entlassen wird und in den Nukleus translozieren kann (Heldring et al., 2007). Da die Expression des Reportergens GFP in der Indikatorzelle von ER/EBNA2 abhängig ist, wäre es möglich, dass die potentiellen „small molecule“-Inhibitoren diese Funktion stören. Die Kontrollzelllinie MR31.6 ermöglicht den Ausschluss von Inhibitoren des Östrogenrezeptors nicht, da in dieser Zelllinie die Expression des Reportergens durch Doxzyklin induziert wird. In Kapitel 5.7.2 (S. 148) ist beschrieben, wie die Hemmung von östrogenabhängigen Prozessen durch potentielle „small molecule“-Inhibitoren ausgeschlossen werden kann.

Das zellbasierte Testsystem eignet sich für den Einsatz in HTS-Verfahren

Bei der Etablierung des zellbasierten Testsystems wurden für die Indikatorzelllinie und die Kontrollzelllinie sowohl die Induktionsdauer als auch die notwendige Konzentration des Induktors bestimmt, welche zu einem halbmaximalen Signal des Reportergens GFP führen (Kapitel 4.5.1 und 4.5.2, S. 103). Obwohl die Messwerte einem Positionseffekt unterliegen, hat das Signal-Window einen Wert von 4,1 und der Z'-Faktor einen Wert von 0,78 in dem zellbasierten Testsystem (Kapitel 4.5.3, S. 106). Folglich eignet sich das zellbasierte Testsystem für den Einsatz in HTS-Verfahren. Konzentrationen von bis zu 1% des Lösungsmittels DMSO, das als Lösungsmittel für „small molecules“ dient, haben keine Auswirkung auf die GFP-Expression (Kapitel 4.5.4, S. 110).

5.4 HTS von „small molecule“-Banken

Sowohl mit dem ELISA-basierten als auch mit zellbasierten Testsystem wurden die inhibitorischen Eigenschaften von insgesamt 1360 chemischen Substanzen aus drei „small molecule“-Banken überprüft: die „small molecule“-Bank des Helmholtz Zentrums München von AnalytiCon Discovery GmbH, die SPECS Naturstoffbank und die NHC Naturstoffbank des Helmholtz Zentrums in Braunschweig. Die Anzahl der „small molecules“, ihr durchschnittliches Molekulargewicht sowie die Endkonzentrationen, die für den HTS verwendet wurden, sind nochmals in Tabelle 22 zusammengefasst.

„small molecule“-Bank	Anzahl der chemischen Substanzen	MW [Da] (im Durchschnitt)	Konzentration im HTS [μM]
SPECS	400	ca. 400	40 - 342
AnalytiCon Discovery	800	ca. 280	22 - 80
Naturstoffbank NHC	160	nicht bekannt	ca. 5

Tabelle 22: Für die „small molecule screens“ verwendeten „small molecule“-Banken

5.4.1 HTS mit dem biochemischen Testsystem

In Kapitel 4.3 ist der „small molecule screen“ der NHC Naturstoffbank als Beispiel dargestellt. In keiner der überprüften Sammlungen konnte eine chemische Substanz identifiziert werden, welche die CBF1/Notch-Interaktion verhindert hätte.

Der Z-Faktor, der dazu dient, die Qualität des „small molecule screens“ zu bewerten, hatte nach Zugabe der Substanzen aus der NHC Naturstoffbank einen Wert von 0,94. Dieser Wert zeigte,

dass die Rahmenbedingungen für die Identifizierung eines „small molecule“-Inhibitors bei den gewählten Reaktionsbedingungen zum Zeitpunkt der Durchführung gegeben waren.

Wie schon zuvor erwähnt, spielt die „chemical tractability“ eine wichtige Rolle in der Wahl der Zielstruktur (Übersicht: Macarron & Hertzberg, 2011). Sie ist nicht allein von der Zielstruktur abhängig, sondern auch von der Art der „small molecule“-Bank, die für einen HTS eingesetzt wird. Die Auswahl der archivierten chemischen Substanzen, die in „small molecule“-Banken zusammengefasst wurden, ist durch die Wahl der ursprünglich als geeignet angesehenen Zielstrukturen beeinflusst worden. Diese Zielstrukturen bestanden aus Enzymen, Kinasen, Hormonrezeptoren, Ionenkanälen und GPCRs, die kleine Bindetaschen oder aktive Zentren hatten und deshalb auch den Einsatz von kleinen Antagonisten erfordert haben. Zu einem Großteil enthalten „small molecule“-Banken Moleküle, die nach den Kriterien der „Lipinski rule of five“ ausgewählt wurden. Allerdings kann dieses Auswahlkriterium dazu führen, dass die Diversität der Moleküle, also ihre Verteilung im „chemical space“, sehr gering ist. Ein Vergleich der Deskriptoren von zugelassenen Medikamenten, die PPIs inhibieren, zeigte, dass sie häufig ein anderes „chemical space“ besetzen als Inhibitoren der ursprünglichen Zielstrukturen (Neugebauer, Hartmann & Klein, 2007). „small molecule“-Banken wie die NHC Naturstoffbank sind eine Alternative zu den ursprünglichen „small molecule“-Archiven, denn sie werden nicht nach den „Lipinski rule of five“ ausgewählt und decken einen größeren „chemical space“ ab, so dass die Diversität größer ist.

Ein weitere Herausforderung ist, dass Leitstrukturen von „small molecule“ Inhibitoren für PPIs häufig erst geringe Affinitäten im hohen mikromolaren Bereich zu ihrer Zielstruktur aufweisen und erst durch Optimierung die erwünschte effektive Konzentration (EC_{50}) erreichen (Whitty & Kumaravel, 2006). Um eine effektive Inhibition einer PPI zu erreichen, sollte der Inhibitor eine Affinität aufweisen, die in dem Bereich der PPI liegt (Übersicht: Buchwald, 2010). Stellt man die CBF1/Notch-Interaktion mit einer K_d von ca. 72 nM, den möglicherweise geringen Affinitäten der nicht optimierten „small molecules“ in einem ersten HTS gegenüber, wird schnell klar, dass eine potentielle inhibitorische Substanz, bereits von Anfang an, eine Affinität aufweisen muss, die mit der Ligandenbindung konkurrieren kann oder wesentlich höhere Konzentrationen des „small molecules“ eingesetzt werden müssen.

Protein/Protein-Interaktionen, die bereits erfolgreich gehemmt wurden, zeigen, dass die Affinität dieser PPIs deutlich geringer ist als die halbmaximale inhibitorische Konzentration ihrer Inhibitoren. Beispielsweise zeigt die MDM2/p53-Interaktion eine K_d von ca. 1 μ M (Kussie et al., 1996). Im Vergleich dazu hat der Inhibitor Nutlin-3a einen IC_{50} Wert von 90 nM (Vassilev et al., 2004). Auch die Bindung von CCR5 an gp120 ist mit einer K_d von 2,2 μ M (Brower, Schon, Klein &

Freire, 2009) deutlich schwächer, als die der Bindung des Inhibitors Maraviroc, der eine halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} von mindestens 6 nM aufweist (Dorr et al., 2005).

Für diese Arbeit standen nur drei kleine „small molecule“-Banken mit insgesamt 1360 Substanzen zur Verfügung. Bei erfolgreichen „small molecule screens“ im Hochdurchsatz in der Industrie wurden mehrere tausend Substanzen auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten überprüft. Daher ist es notwendig, weitere „small molecule“-Banken mit großer Diversität in dem ELISA-basierten Testsystem zu „screenen“, um eine Leitstruktur für einen Inhibitor der CBF1/Notch-Interaktion zu identifizieren.

5.4.2 HTS mit dem zellbasierten Testsystem

Der „small molecule screen“ zur Identifizierung von Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2 wurde im 96-Loch-Format und mit dem Hochdurchsatz-Adapter am Durchflusszytometer BD LSR-II™ durchgeführt. Insgesamt wurde der Einfluss von 1360 Substanzen aus den drei, in Tabelle 22 aufgelisteten, „small molecule“-Banken auf die ER/EBNA2-abhängige GFP-Expression überprüft. In Kapitel 4.5.3 (S. 106) wurde bestimmt, dass die maximale Expression des Reportergens um mindestens 37% gehemmt werden muss, damit die Wahrscheinlichkeit einen potentiellen Inhibitor zu identifizieren, bei $p(\text{Hit}) = 1$ liegt. Um in dem HTS möglichst viele potentielle Inhibitoren zu identifizieren und dabei die Rate der falsch positiven Treffer zu minimieren, wurde bestimmt, dass ein „small molecule“ die GFP-Expression um mindestens 50% des maximalen Signals reduzieren muss, damit es als potentieller Inhibitor angesehen wird. Neben dem Fluoreszenzsignal des GFP-Proteins wurde gleichzeitig der Anteil der lebenden Zellen bestimmt, so dass es möglich war, während derselben Messung Substanzen auszuschließen, die einen toxischen Effekt auf die Indikatorzelllinie haben. Nur in der Naturstoffbank NHC des HZI konnten 16 Moleküle identifiziert werden, welche die GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 um mindestens 50% gehemmt haben und keinen toxischen Effekt auf die Zellen hatten (Kapitel 4.6). Die Wirkung dieser „small molecules“ wurde im weiteren Verlauf genauer untersucht.

5.5 Ausschluss von Inhibitoren, die nicht spezifisch die ER/EBNA2-Funktion blockieren

In der Kontrollzelllinie MR31.6 kann die Expression des Reporterproteins GFP durch die Zugabe von Doxzyklin und unabhängig von EBNA2 oder CBF1 induziert werden (Kapitel 4.4.2, S. 101). Die Zugabe von spezifischen „small molecule“-Inhibitoren der EBNA2-abhängigen Transaktivierung sollte deshalb keinen Einfluss auf die GFP-Expression dieser Zelllinie haben. Die Wirkung der 16 Moleküle, welche das GFP-Fluoreszenzsignal in der Indikatorzelllinie um mindestens 50% reduziert haben, wurde in der Kontrollzelllinie MR31.6 überprüft. Neun Naturstoffe haben die GFP-Expression auch in der Kontrollzelllinie reduziert. Fünf dieser „small molecules“ sind schon zuvor als Inhibitoren der Translation beschrieben worden: Gephyronic acid (Sasse et al., 1995) und die Vioprolide A bis D (Schummer et al., 1996). Diese Substanzen inhibieren die Translation aller Proteine und nicht nur die EBNA2-abhängige Translation von GFP. Cruentaren A behindert die ATP-Hydrolyse in Mitochondrien und hemmt so den Energiehaushalt der Zelle (Kunze et al., 2006). Saframycin führt zu Modifikationen der DNA, so dass diese nicht mehr als Template zur DNA- und RNA-Synthese verwendet werden kann (Irschik et al., 1988). Tubulysin verhindert die Polymerisation von Mikrotubuli, so dass Mikrotubuli abhängige Prozesse wie die Mitose gestört werden (Sasse et al., 2000; Steinmetz et al., 2004). Die übrigen sieben Naturstoffe verbleiben potentielle Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2 und sind in Tabelle 23 zusammen gefasst.

„small molecule“	Organismus	Quelle	Auswirkung auf
Chondramid A	<i>Chondromyces crocatus</i>	(Kunze et al., 1995)	Aktinpolymerisation
Chondramid B			
Chondramid C			
Chondramid D			
Chivosazol A	<i>Sorangium cellulosum</i>	(Diestel et al., 2009; Irschik, Jansen, et al., 1995)	Aktinpolymerisation
Rhizopodin	<i>Myxococcus stipitatus</i>	(Hagelueken et al., 2009; Sasse et al., 1993)	
Kulkenon	<i>Sorangium Cellulosum</i>	Jahresbericht HZI Braunschweig 2001	nicht bekannt

Tabelle 23: Naturstoffe, die nur die EBNA2-abhängige GFP-Expression in der Indikatorzelllinie inhibieren

5.6 Potentielle Inhibitoren der EBNA2-abhängigen Transaktivierung

Sieben Naturstoffe haben nur die ER/EBNA2-abhängige GFP-Expression in der Indikatorzelllinie inhibiert. Erstaunlicherweise lassen sich sechs dieser potentiellen Inhibitoren aufgrund eines bisher beschriebenen Wirkmechanismus zu einer Gruppe zusammenfassen, denn sie beeinflussen die Aktinpolymerisation. Die molekularen Wirkmechanismen der sieben Naturstoffe, die potentielle Inhibitoren der ER/EBNA2-abhängigen Transaktivierung sind, sollen, soweit sie bereits bekannt sind, im Folgenden erklärt werden.

5.6.1 Struktur und Funktion des Proteins Aktin

Das Aktin-Molekül (G-Aktin) besteht aus einer Kette von 375 Aminosäuren, die nach Ausbildung von Domänen in der Tertiärstruktur eine Furche bilden, die ATP oder ADP bindet. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Polymerisation des G-Aktin zu einem Doppelhelix Filament, das F-Aktin genannt wird. F-Aktin befindet sich in stetigem Auf- und Abbau. Die Enden des Aktinfilaments werden als „plus end“ („barbed“), an dem der Aufbau schnell vorangeht, und als „minus end“ („pointed“), an dem der Aufbau langsam vorangeht, bezeichnet. Wenn die Menge der freien G-Aktin-Moleküle der Menge der frei werdenden G-Aktin-Moleküle entspricht, wird ein Gleichgewicht erreicht, in dem das F-Aktin seine Größe nicht mehr verändert (Übersicht: Alberts, 2008).

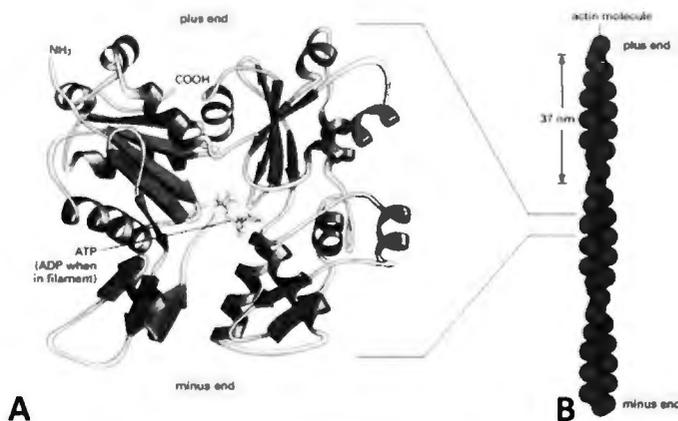


Abbildung 35: Struktur von G-Aktin und einem Aktinfilament (Übersicht: Alberts, 2008)

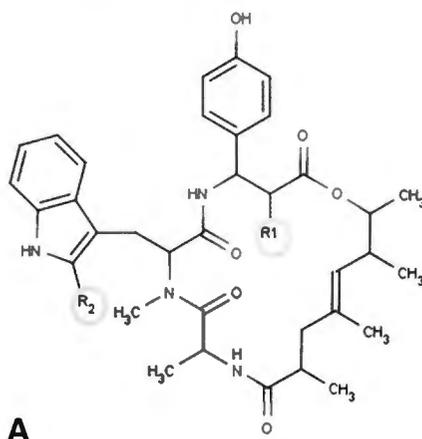
(A) zeigt die Tertiärstruktur von G-Aktin, das in der Furche im Zentrum des Monomers ein Nucleotid (ATP oder ADP) gebunden hat. (B) zeigt die Aneinanderreihung der G-Aktin-Monomere zu einem Filament, in dem alle Moleküle die gleiche Orientierung haben.

Aktinfilamente sind Bestandteil des Zytoskeletts, an der Zelladhäsion beteiligt, bilden die strukturelle Grundlage für zelluläre Ausstülpungen wie Filopodien, sie umhüllen endozytotische und phagozytotische Vesikel und sind eine wichtige Komponente bei der Ausbildung des kontraktilen Rings während der Mitose und der Meiose (Übersicht: Schoenenberger, Mannherz & Jockusch, 2011). Auch im Zellkern sind Aktinfilamente von großer Bedeutung. Sie kleiden die innere Kernmembran aus, sind Teil des Chromatingerüsts, an der Modifikation des Chromatins beteiligt und interagieren mit konservierten Subgruppen der RNA Polymerasen I, II und III (Übersicht: Schleicher & Jockusch, 2008).

Es gibt zwei Gruppen von Naturstoffen, welche die Aktinpolymerisation beeinflussen. Ihr Wirkmechanismus wurde hauptsächlich in adhärenenten Zellen wie z.B. Fibroblasten untersucht. Die erste Gruppe stabilisiert F-Aktinfilamente und die zweite Gruppe verhindert die Polymerisation zu F-Aktin oder destabilisiert die Filamente (Übersicht: Allingham, Klenchin & Rayment, 2006).

5.6.2 Chondramide stabilisieren F-Aktin

Chondramide sind Cyclodepsipeptide, die aus dem Myxobakterienstamm *Chondromyces crocatus* isoliert wurden (Kunze et al., 1995). Die vier Chondramide A bis D, deren Auswirkung auf die EBNA2-abhängige Transaktivierung in dieser Arbeit untersucht wurde, unterscheiden sich jeweils in zwei Resten (R1 und R2). Abbildung 36 zeigt die gemeinsame Strukturformel der Chondramide.



Chondramid	R1	R2
A	OCH ₃	H
B	OCH ₃	Cl
C	H	H
D	H	Cl

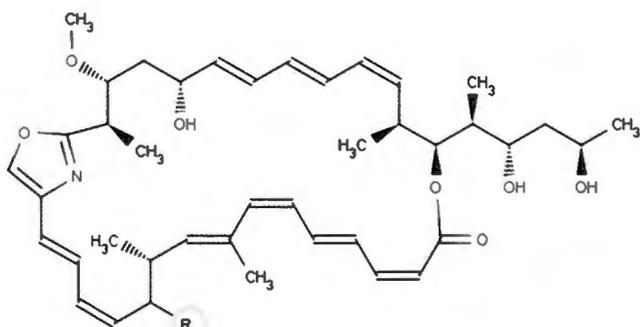
Abbildung 36: Struktur der Chondramide A bis D

(A) Dargestellt ist die Strukturformel, die den Chondramiden A bis D gemeinsam ist. Gelb markiert sind die Reste, R1 und R2, welche die Chondramide unterscheiden. (B) Die Atome, die R1 und R2 in den unterschiedlichen Molekülen besetzen, sind in der Tabelle gelistet.

Chondramide sind membrangängig und wirken zytostatisch auf das Wachstum von Tumorzelllinien. Die Konzentrationen der Naturstoffe, welche die Proliferation von adhärenen Zellen um 50% hemmen (IC_{50}), liegen in einem Bereich von 3 bis 85 nM. Die Behandlung von Zellen mit diesen Naturstoffen führt zunächst (ca. eine Stunde nach Zugabe) zu einem Anstieg von diffusem F-Aktin und F-Aktin-Klumpen nahe des Zellkerns, sowie zur Bildung von Knoten in den Aktinfilamenten. Im weiteren Verlauf (ca. 4 h nach Zugabe) kommt es zur Auflösung der Fibrillenbündel aus Aktin und Myosin, sowie zu vergrößerten Zellen mit zwei oder mehr Zellkernen, was bedeutet, dass die Mitose nicht mehr ausgeführt werden kann. *In vitro* führt die Zugabe von Chondramid zu verstärkter Aktinpolymerisation (Sasse, Kunze, Gronewold & Reichenbach, 1998) und Stabilisierung der Aktinfilamente durch gleichzeitiges Binden von mehreren Aktin Monomeren. Ein weiterer Naturstoff, das Jaspamid oder Jaspalakinolid, das aus dem marinen Schwamm *Jaspis johnstoni* isoliert wurde und den Chondramiden in der Struktur sehr ähnlich ist, zeigt den gleichen Wirkmechanismus (Übersicht: Allingham et al., 2006). Mittlerweile ist es gelungen, Chondramid A (Schmauder, Sibley & Maier, 2010) und Chondramid C (Waldmann et al., 2008) synthetisch herzustellen. Dies sollte die weitere Präparation von unterschiedlichen Analoga ermöglichen.

5.6.3 Chivosazol A bewirkt die F-Aktin-Depolymerisation

Das Makrolid Chivosazol ist ein Metabolit des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum*. Es gibt zwei Formen, Chivosazol A und Chivosazol F, die sich in einem Rest unterscheiden (Abbildung 37). Chivosazol A ist der Hauptstellvertreter der Chivosazole, die antimykotisch und zytotoxisch auf Mausfibroblasten und HeLa-Zellen wirken (Irschik, Jansen, et al., 1995).



Chivosazol A R= 2,3-dimethoxy-6-deoxy-glucosyl

Chivosazol F R=OH

Abbildung 37: Struktur der Chivosazole

Dargestellt ist die Strukturformel der Chivosazole. Chivosazol A, das ein potentieller Inhibitor der EBNA2-abhängigen Transaktivierung ist, unterscheidet sich von Chivosazol F in einem Rest (R), der gelb markiert ist.

Chivosazole sind wirksame Inhibitoren der Proliferation von einigen humanen Tumorzelllinien, wobei der IC_{50} -Wert von Chivosazol A in einem Konzentrationsbereich von 3 bis 12 nM liegt. Bereits 15 min nach Zugabe von Chivosazol können erste Veränderungen des Zytoskeletts beobachtet werden. Das Zytoskelett löst sich auf und es entstehen punktförmige Aggregate. Werden Zellen für mehrere Stunden mit Chivosazol behandelt, kommt es zu einer Verzögerung des Zellzyklus in der G_2/M Phase, sowie zu einem weiteren Anstieg des DNA-Gehalts in den Zellen, was darauf hindeutet, dass diese mehr als einen Nukleus haben und die Mitose nicht durchgeführt werden kann. In zellfreien Experimenten wurde gezeigt, dass die Polymerisation von G-Aktin inhibiert wird und F-Aktin depolymerisiert (Diestel et al., 2009). Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt.

5.6.4 Rhizopodin bewirkt die Dimerisierung von G-Aktin

Rhizopodin ist ebenfalls ein Makrolid und wurde aus dem Myxobakterium *Myxococcus stipidatus* isoliert (Sasse et al., 1993). Die Zugabe von Rhizopodin in nanomolaren Konzentrationen führt bereits zur Veränderung der Zellmorphologie. Die Zellen bilden Fortsätze aus und nehmen an Größe zu, teilen sich jedoch nicht, was zu mehrkernigen Zellen führt. Fibrillenbündel fangen nach 10 min an, sich aufzulösen und nach 2 h sind deutliche Lücken in den Aktinfilamenten zu erkennen. In den Lücken bilden sich stattdessen Aggregate aus G-Aktin (Gronewold et al., 1999).

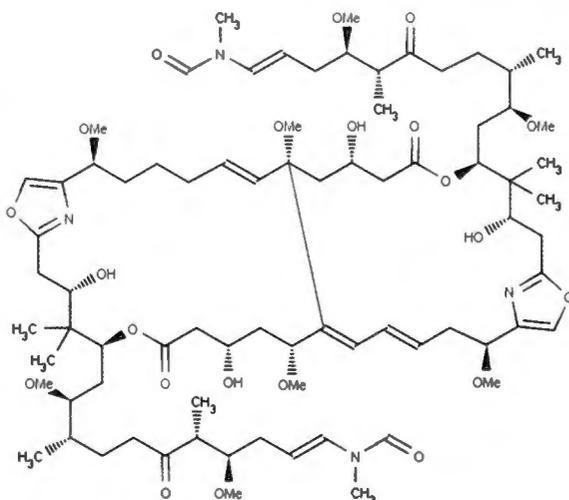


Abbildung 38: Struktur von Rhizopodin

Dargestellt ist die Strukturformel von Rhizopodin.

Rhizopodin ist ein Dilakton, was bedeutet, dass sich die biologisch aktive Form aus zwei identischen Laktonen zusammensetzt. Die Symmetrieachse ist hier grün markiert.

In zellfreien Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein Rhizopodin Dilakton jeweils zwei G-Aktine bindet. Durch Kristalle des Aktin/Rhizopodin-Komplexes konnte beschrieben werden,

dass die Seitenketten des Rhizopodin-Dilaktons ein G-Aktin binden und dadurch eine Dimerisierung bewirken, welche die Polymerisation verhindert.

5.6.5 Kulkenon hat keine Auswirkung auf das Zytoskelett

Das „small molecule“ Kulkenon ist ein Makrolid, das von dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* synthetisiert wird. Die Struktur dieses Naturstoffes ist in Abbildung 39 dargestellt.

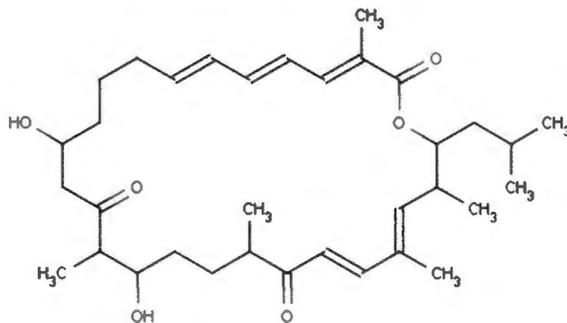


Abbildung 39: Struktur von Kulkenon

Dieser Naturstoff wurde zuvor als mäßig toxische Substanz beschrieben und liegt in drei Isoformen vor. Eine „High Content Analyse“ wurde durchgeführt, die durch Verwendung von Fluoreszenzfärbungen in Kombination mit automatisierter mikroskopischer Bildaufnahme und -auswertung ermöglicht, eine Vielzahl von zellulären Parametern (z.B. Zytotoxizität, Auswirkung auf den Zellzyklus oder das Zytoskelett) gleichzeitig zu bestimmen. So können die Naturstoffe anhand ihres Einflusses auf diese Parameter in Wirkgruppen eingeteilt werden. In dieser Analyse hat Kulkenon keinen Einfluss auf das Zytoskelett bzw. die Aktinpolymerisation von adhärenenten Zellen. Weitere Informationen zum Wirkmechanismus dieses Naturstoffes gibt es bisher nicht.

5.7 Beispiele für mögliche Szenarien der Inhibition in der Indikatorzelllinie JV06

Inhibitoren, die nicht spezifisch die ER/EBNA2-Funktion blockieren, konnten durch Experimente mit der Kontrollzelllinie MR31.6 ausgeschlossen werden. In Abbildung 40 sind mehrere Beispiele für mögliche Szenarien der Inhibition der ER/EBNA2-abhängigen GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 des zellbasierten Testsystems zusammengefasst. Eine Möglichkeit wäre, dass die Translokation von EBNA2 aus dem Zytoplasma in den Nukleus verhindert wird (Abbildung 40 A). Es ist bisher nicht genau bekannt, durch welchen Mechanismus die

Translokation von EBNA2 in den Nukleus erfolgt, aber es wäre möglich, dass Aktin dabei eine wichtige Rolle spielt. Eine zweite Möglichkeit ist, dass die Inhibition aufgrund des östrogenabhängigen Testsystems erfolgt, da für die Aktivierung der Transkription die Bindung von Östrogen an das Fragment des Östrogenhormonrezeptors notwendig ist. Wird diese Interaktion gehemmt, so kommt es auch zur Inhibition der GFP-Expression (Abbildung 40 B). Für die Translokation in den Nukleus muss das Fusionsprotein ER/EBNA2 aus dem Komplex mit HSP90 entlassen werden. Falls dieser Schritt durch eine chemische Substanz blockiert wird, ist die GFP-Expression ebenfalls gehemmt (Abbildung 40 C). Schließlich kann die Inhibition spezifisch EBNA2 oder CBF1 hemmen. Wird die Bindetasche innerhalb von CBF1 oder die für die EBNA2-Bindung notwendige Aminosäure Q307, welche die Bindetasche flankiert (Fuchs et al., 2001), blockiert, kann EBNA2 nicht mit CBF1 interagieren und die CBF1-abhängige Transaktivierung durch EBNA2 wird gehemmt (Abbildung 40 D). Zum anderen ist für die transkriptionelle Aktivierung von EBNA2-Zielgenen, wie z.B. LMP1, die Dimerisierung von EBNA2 notwendig (Gordadze et al., 2004). Es wäre also durchaus möglich, dass ein „small molecule“, welches die homotypische Interaktion von EBNA2-Proteinen verhindert, auch die CBF1-abhängige Transaktivierung durch EBNA2 hemmt (Abbildung 40 E). Des Weiteren gibt es mehrere Möglichkeiten der Inhibition, durch die auch andere Prozesse außerhalb der Zielstruktur beeinflusst werden können. Ein Inhibitor kann die Interaktion von EBNA2 oder CBF1 mit weiteren, für die Transkription notwendigen, Co-Faktoren hemmen (Abbildung 40 F). Erfolgt die Inhibition durch Bindung des „small molecules“ an CBF1 oder EBNA2, so ist die Inhibition spezifisch für die EBNA2-abhängige Transaktivierung. Bindet die Substanz allerdings an einen Co-Faktor, so kann das auch zur Hemmung der Transkription von EBNA2-unabhängigen Zielgenen führen. Schließlich besteht noch die Möglichkeit, dass die Bindung von CBF1 an das CBF1-RE innerhalb des Promotors durch ein „small molecule“ blockiert wird (Abbildung 40 G). Diese Art der Inhibition würde die Regulation von weiteren CBF1-abhängigen Prozessen, wie z.B. des kanonischen Notch-Signalweges beeinflussen und ist deshalb nicht strikt EBNA2-spezifisch. In den folgenden Kapiteln wird dargestellt, welche dieser Szenarien für die Inhibition der EBNA2-abhängigen GFP-Expression in der Indikatorzelllinie JV06 verantwortlich sein könnten.

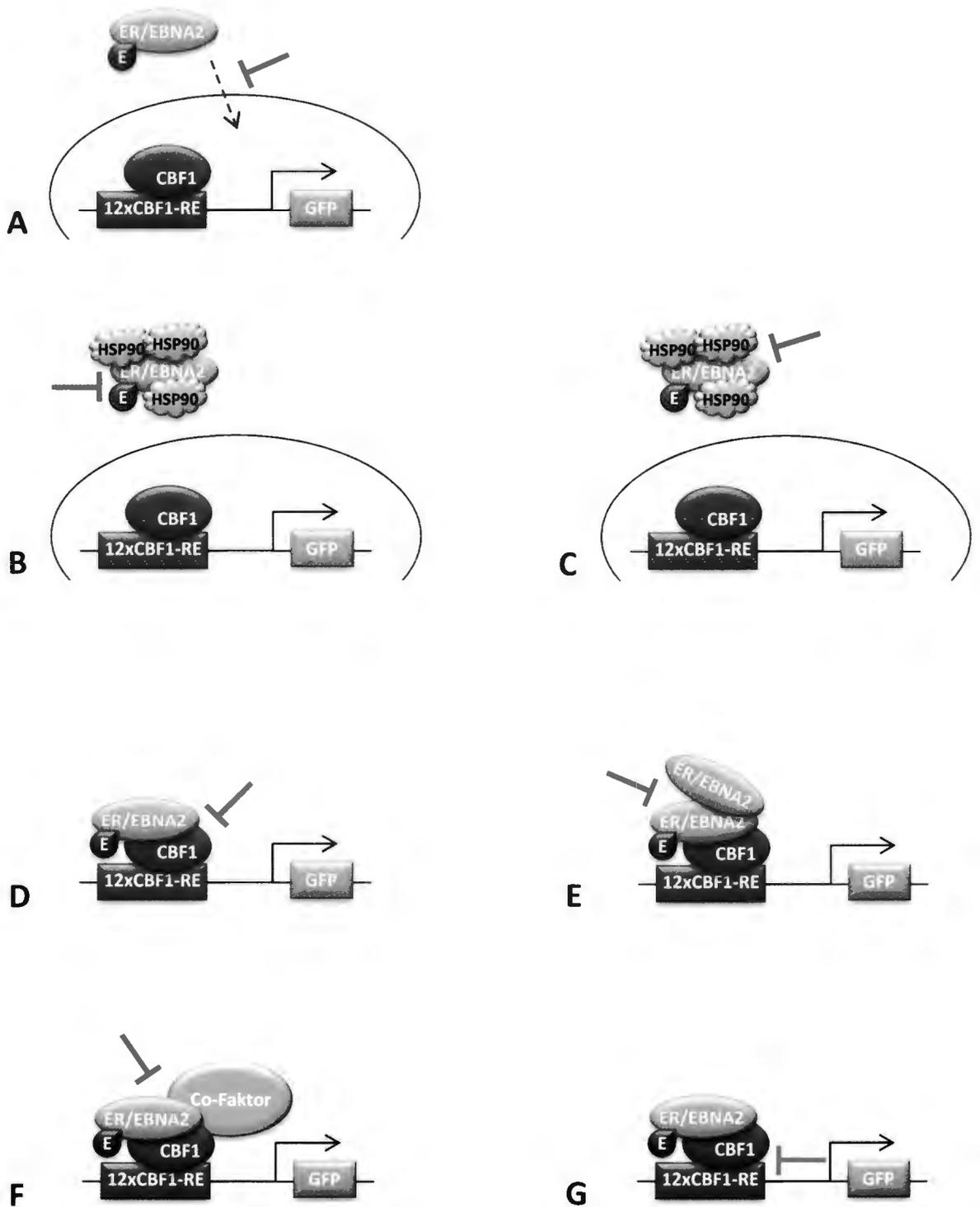


Abbildung 40: Überblick einiger möglicher Szenarien der GFP-Expression im zellulären Testsystem

Dargestellt sind die Proteine CBF1 (blau), ER/EBNA2 (orange), HSP90 (graue Wolke) und mögliche Co-Faktoren (grau). Östrogen (E), das an die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) bindet, ist braun abgebildet. CBF1 bindet an das CBF1 „Response Element“ (CBF1-RE), welches im Promotorbereich des Reportergens GFP (grün) in 12

Wiederholungen vorliegt. Beispiele für die Inhibition der GFP-Expression in der Indikatorzelllinie sind: **(A)** Inhibition der Translokation von EBNA2 in den Nukleus. **(B)** Inhibition der Bindung von Östrogen (E) an das Fragment der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER). **(C)** Inhibition der Entlassung von EBNA2 aus dem Komplex mit HSP90. **(D)** Inhibition der Interaktion von CBF1 und EBNA2. **(E)** Inhibition der Dimerisierung der EBNA2-Proteine. **(F)** Inhibition der Interaktion von CBF1 oder EBNA2 mit Co-Faktoren. **(G)** Inhibition der Bindung von CBF1 an CBF1-RE.

5.7.1 Der Aktininhibitor Cytochalasin D hat keinen Einfluss auf die Expression des Reportergens GFP

Da sechs der sieben potentiellen Inhibitoren bereits als Hemmstoffe der Aktinpolymerisation beschrieben wurden, sollte überprüft werden, ob die Aktinpolymerisation eine Rolle in der Expression von GFP, sowohl in der Indikatorzelllinie JV06 als auch in der Kontrollzelllinie MR31.6, spielt. Zu diesem Zweck wurde der Naturstoff Cytochalasin D, ein Metabolit des Organismus *Zygosporium mansonii*, verwendet. Diese Substanz wird bereits seit den 70er Jahren zur Untersuchung von Aktin und seiner Funktion verwendet (Tannenbaum, Tanenbaum, Lo, Godman & Miranda, 1975). Cytochalasin D kann an F-Aktin binden und verhindert so die Polymerisation am „barbed end“ des F-Aktins (Nair et al., 2008). Außerdem führt die Zugabe des Moleküls zur Dimerisierung von G-Aktin (Goddette, Uberbacher, Bunick & Frieden, 1986) und zur Bildung von Aktin-Aggregaten (Mortensen & Larsson, 2003). Die Bindung von G-Aktin und auch F-Aktin entspricht der Wirkung von Rhizopodin A. In Abbildung 41 ist die Strukturformel von Cytochalasin D dargestellt.

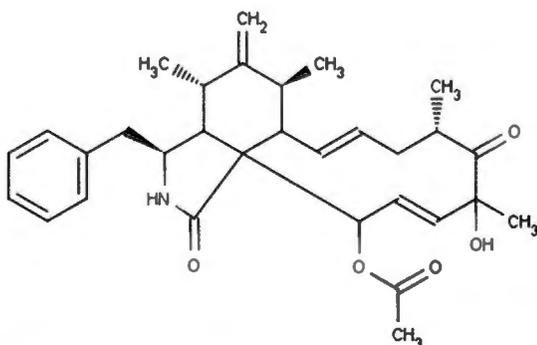


Abbildung 41: Struktur von Cytochalasin D

In beiden Zelllinien hat die Zugabe von Cytochalasin D keine negativen Auswirkungen auf die GFP-Expression (Kapitel 4.6.3, S. 122). In der Kontrollzelllinie MR31.6 steigt unerwarteterweise die Fluoreszenzintensität von GFP konzentrationsabhängig nach Zugabe von Cytochalasin D an. Aufgrund dieser Daten kann ausgeschlossen werden, dass die Neubildung von Aktinfilamenten in dem untersuchten Zeitraum von 16 h für die Expression des Reportergens GFP notwendig ist. Da Cytochalasin D die Depolymerisation von F-Aktin fördert und die Polymerisation verhindert, hat es eine andere Wirkungsweise als die Chondramide, welche F-Aktin stabilisieren. Um auszuschließen, dass sich auch die Stabilisierung der Aktinfilamente auf die GFP-Expression auswirkt, könnten die Naturstoffe Jasplakinolid oder Phalloidin verwendet werden. Diese Naturstoffe haben eine ähnliche Struktur und wirken ebenso wie Chondramide und sind außerdem kommerziell erhältlich.

5.7.2 Inhibition der GFP-Expression aufgrund des östrogenabhängigen zellulären Testsystems

Um die potentielle Inhibition des Östrogenrezeptors durch die in dieser Arbeit identifizierten „small molecules“ zu untersuchen, eignet sich die Brustkrebszelllinie MCF-7. In dieser Zelllinie konnte die östrogenabhängige Regulation von Zielgenen mehrfach nachgewiesen werden (Jagannathan & Robinson-Rechavi, 2011). Gut beschriebene Zielgene sind z.B. TFF1 („trefoil factor 1“) und GREB1 („gene regulated in breast cancer 1“). Ihre Expression wird in MCF-7 Zellen 24 h nach Zugabe von Östrogen ca. 3-fach (TFF1) (Espino, Li, He, Yu & Davie, 2006) bzw. 30-fach (GREB1) (Rae et al., 2005) induziert, so dass der Unterschied durch RT-PCR nachgewiesen werden kann. Falls die „small molecule“-Inhibitoren den Östrogenhormon-rezeptor beeinflussen, würde die Änderung der Genexpression von TFF1 oder GREB1 durch die Zugabe der Naturstoffe verhindert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits die notwendigen Reagenzien und Bedingungen für den Nachweis der RNA von TFF1 und GREB1 in RT-PCR Experimenten etabliert. Allerdings war es nicht möglich, die Regulation dieser Zielgene in der MCF-7 Zelllinie nachzuweisen. Es ist jedoch bekannt, dass diese Zelllinie nach einiger Zeit in Kultur ihre Empfindlichkeit gegenüber Östrogen verliert und deshalb keine Regulation von Östrogen-Zielgenen möglich ist.

„Heat shock“ Proteine (HSP) wurden zunächst im Zusammenhang mit der zellulären Antwort auf Stress durch Hitze identifiziert. Sie sind allerdings noch an vielen weiteren Prozessen beteiligt. In ihrer Funktion als Chaperone verhindern sie die Missfaltung von Proteinen, sind an Signalwegen, der Chromatinmodifikation und der Regulation von Zielgenen beteiligt (Zhao, R. & Houry, 2005).

Das Protein HSP90 bindet, wie schon erwähnt, an die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors und verhindert dadurch dessen Translokation in den Nukleus (Heldring et al., 2007). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass HSP90 mit G-Aktin interagiert und die Inhibition von HSP90 zur Hemmung der Aktinpolymerisation führt (Taiyab & Rao Ch, 2011). Möglicherweise wird die Bindung von HSP90 und G-Aktin durch Zugabe der Naturstoffe stabilisiert, so dass EBNA2 nicht aus dem Komplex entlassen werden und die Transkription des Reportergens induzieren kann.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Verwendung von Östrogen für die Regulation der Aktivität von Proteinen bedacht werden sollte, ist, dass Östrogen die Reorganisation des Zytoskeletts verursacht. Dieser Effekt beruht auf dem nicht-genomischen Signalweg durch membrangebundene Östrogenhormonrezeptoren (Simoncini et al., 2006). Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von Östrogen hatten keine Auswirkung auf die Viabilität der Zellen. Veränderungen des Zytoskeletts wurden in den in dieser Arbeit verwendeten Suspensionszelllinien nicht untersucht. Die Reorganisation des Zytoskeletts kann jedoch, im Zusammenhang mit gleichzeitiger Zugabe von Substanzen, welche die Aktinpolymerisation beeinflussen, kumulative Auswirkungen haben.

Die hormonabhängige Regulation von Zielgenen durch den Östrogenrezeptor spielt in der Entstehung von schwerwiegenden Erkrankungen wie Brusttumoren, Prostata Tumoren, Ovarialkarzinomen und Osteoporose eine wichtige Rolle (Lonning et al., 2011). Aus diesem Grund dient der Östrogenrezeptor als Zielstruktur bei der Behandlung dieser Erkrankungen. Zur Behandlung werden SERMs („selective estrogen receptor modulators“), die Antagonisten von Östrogen sind, verwendet. Ein Beispiel für einen SERM ist Tamoxifen, das bereits seit 1970 bei der Therapie von Brustkrebs angewendet wird (Ellmann et al., 2009). Falls die hier identifizierten potentiellen Inhibitoren den Östrogenrezeptor beeinflussen und nicht die EBNA2-abhängige Transaktivierung, wären sie ebenfalls für die Therapie von Krebserkrankungen interessant und sollten hinsichtlich ihrer molekularen Wirkmechanismen genauer untersucht werden.

5.8 Ausblick

Die durchgeführten „small molecule screens“ der 1360 Moleküle aus den Banken des Helmholtz Zentrums München von AnalytiCon Discovery GmbH, der SPECS Naturstoffbank und der Naturstoffbank des Helmholtz Zentrums in Braunschweig haben im ELISA-basierten Testsystem nicht zur Identifizierung von potentiellen Inhibitoren der CBF1/Notch-Interaktion geführt. Da dieses Testsystem aber alle Kriterien für den Einsatz als HTS erfüllt, ist wahrscheinlich nur der

Test von weiteren „small molecule“-Banken notwendig, um eine geeignete Leitstruktur zu erhalten.

Mit dem zellbasierten Testsystem war es möglich, sieben potentielle Inhibitoren der CBF1-abhängigen Transaktivierung durch EBNA2 zu identifizieren. Es wurde gezeigt, dass die Minderung der GFP-Fluoreszenz nicht von der Neubildung von Aktinfilamenten abhängig ist. Die Funktion des Naturstoffes Kulkenon ist weitgehend unbekannt, weshalb diese Substanz ein viel versprechender Kandidat für die spezifische Inhibition ist und im Weiteren genauer untersucht werden sollte. Auch der molekulare Wirkmechanismus der Moleküle, welche die Aktinpolymerisation beeinflussen, sollte in weiteren Experimenten kontrolliert werden. Mit den Naturstoffen Jasplakinolid oder Phalloidin sollte überprüft werden, ob auch die Stabilisierung von F-Aktin keine Auswirkungen auf die Expression des Reportergens GFP hat. Außerdem ist es zum einen notwendig, den Östrogenhormonrezeptor als mögliche Zielstruktur der Inhibitoren auszuschließen. Dafür können die Expressionslevel von östrogenabhängigen Zielgenen wie TFF1 oder GREB1 in Gegenwart und Abwesenheit der Naturstoffe und einer neuen MCF-7 Zelllinie untersucht werden. Zum anderen ist notwendig, den Einfluss der Inhibitoren auf die Funktion des Proteins EBNA2 und nicht des Fusionsprotein ER/EBNA2 zu überprüfen. Für diese Untersuchung eignen sich einerseits Analysen der Expression von EBNA2-Zielgenen in Zelllinien wie Raji. Die Viabilität dieser Zelllinie ist nicht von EBNA2 abhängig, so dass nur die Expression der EBNA2-Zielgene durch potentielle Inhibitoren gehemmt werden sollte. Andererseits kann die Viabilität von Zelllinien wie LCLs, deren Überleben von EBNA2 abhängig ist, unter Zugabe der potentiellen Inhibitoren untersucht werden.

Schließlich besteht die Möglichkeit, die Spezifität der Substanzen mit biochemischen Methoden, wie dem ELISA-basierten Testsystem zur CBF1/EBNA2-Interaktion, das nur Substanzen identifiziert, die den „hot spot“ der Interaktion inhibieren, zu überprüfen. Weitere biochemische Methoden, um den molekularen Wirkmechanismus der Naturstoffe zu klären, sind Affinitätspräzipitationen in An- und Abwesenheit der Naturstoffe. Bindet ein „small molecule“ in der hydrophoben Bindetasche von CBF1, so würde eine inhibitorische chemische Substanz die Präzipitation von CBF1 mit einem Peptid, welches das WxP-Motiv enthält, verhindern. Ist die Zielstruktur des Moleküls die DNA-Binderegion von CBF1, so wird die Präzipitation von CBF1 durch DNA gehemmt. Naturstoffe, welche die Dimerisierung von EBNA2 verhindern, hemmen die homotypische Präzipitation von zwei EBNA2-Proteinen. Schließlich besteht die Möglichkeit, durch NMR-Strukturen die Bindung der Naturstoffe, an die Dimerisierungsdomäne von EBNA2 oder an die hydrophobe Tasche von CBF1, nachzuweisen.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikroliter
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μM	mikromolar
A	2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat
Abb.	Abbildung
ADAM10	a disintegrin and metalloprotease
ADME	<u>a</u> bsorption of the drug from the blood, <u>d</u> istribution of the drug in the body, <u>m</u> etabolism of the drug over time and <u>e</u> xcretion of the drug
AIID	Arthritis, immune and inflamatory disorder
Amp	Ampicillin
ANK	sieben Ankyrin Wiederholungen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BTD	beta-trefoil Domäne
C/EBP	<u>C</u> CAAT/ <u>e</u> nhancer <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
CBF1	C-promotor binding factor
CD21	Komplementrezeptor CR2
CDR	complementarity determining regions
CIR	CBF1 interacting corepressor
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Cp	C-Promotor
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CR	konservierte Region
CSL	CBF1, SuH und Lag-1
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTD	C-terminale Domäne
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DIM	Dimerisierungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
ds	doppelsträngig
DSL	Delta, Serrate / Jagged in <i>D.melanogaster</i> und Säugern sowie Lag-2 in <i>C. elegans</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Östrogen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBF	early b-cell factor
EBNA	Epstein-Barr-Virus Nukleäres Antigen
EC ₅₀	halbmaximale effective Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors
ERE	estrogen responsive element
ETS	E-twenty six
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
fo	<i>forward</i>
FPA	fluorescence polarization assay
G	2'-Desoxyguanosin-5'-phosphat
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GPCR	G-protein coupled receptor
GSI	γ -Sekretase Inhibitor
Gy	Gray
h	Stunden (hours)
HCl	Hydrogenchlorid
HDAC	Histone deacetylase complex
HDD	Heterodimerisierungsdomäne
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HHV4	Humanes Herpesvirus 4
HL	Hodgkin Lymphom
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSP	heat shock protein
HTS	high throughput screening
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IM	Infektiöse Mononukleose
ITC	isothermal titration calorimetry
K	Lysin
K.O.	knock out
kb	Kilobasenpaar(e)
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo Dalton
Lag-1	lin-12 and glp-1
LB	Luria-Bertani
LMP	latent membrane protein
LNR	Lin12-Notch repeats“
M	Mol
mA	Milliampere
MAML1	mastermind-like protein 1
max.	maximal
mF	Millifarad
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
mind.	mindestens
MINT	Msx2-interacting nuclear target protein
miRNA	mikro RNA
ml	Milliliter
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
mt	Mutante

MW	Molekulargewicht
NECD	notch extracellular domain
NEXT	notch extracellular truncation
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	nuclear factor- κ B
ng	Nanogramm
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
Notch-IC	intrazellulären Notch-Fragments
NPC	Nasopharynx Karzinom
NRR	negativ regulierende Region
NTD	N-terminale Domäne
O-fut	O-fucosyl transferase
P	Prolin
PAA	Polyacrylamid
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCNSL	primary central nervous system lymphoma
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEST	prolin-, glutamin-, serin- und threonin-reiches Motiv
polyP	prolinreiche Region
PPI	Protein/Protein-Interaktion
PPII	Inhibitor von Protein/Protein-Interaktionen
PTLD	Posttransplantat Lymphom
PURO	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAM	RBP κ (CBF1) Assoziationsmodul
rev	reverse
RFP	Red fluorescence protein
RG	Arginin-Glycin Wiederholungen
RHR	Rel-homologe Region
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RUNX	runt-related transcription factor
Sap30	Sin3A-associated protein, MW 30kDa
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SHARP	SMRT/HDAC1 associated repressor protein
SKIP	Ski-interacting protein
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors
SPR	surface plasmon resonance
β C4	langes β -Faltblatt
SuH	suppressor of hairless
T	2'-Desoxythymidin-5'-phosphat
Tab.	Tabelle
TACE	TNF- α -converting enzyme
TAD	Transaktivierungsdomäne

TAE	Tris-acetat-EDTA
T-ALL	T-Zell akuten lymphoblastischen Leukämien
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TMD	Transmembrandomäne
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TR-FRET	time resolved fluorescence resonance energy transfer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Tryptophan
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
α	alpha (anti)
Δ	delta

7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Identifizierung von Inhibitoren der Notch- oder EBNA2-vermittelten Transaktivierung von Zielgenen“

von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

München, 08. Mai 2012

Agnes Nowak

8 Danksagung

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

Prof. Dr. Bettina Kempkes für das Überlassen des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. Florenz Sasse und Bettina Hinkelmann vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig für die Kooperation.

Dr. Joseph Mysliwicz für die Hilfe bei den zellbasierten HTS.

Meinen (ehemaligen) Laborkollegen und auch den Kollegen aus dem Gang: Laura Glaser, Kerstin Görke, Katharina Heinzemann, Marie Hertle, Barbara Scholz, Sybille Thumann für die freundschaftliche und lustige Atmosphäre im Labor (und auf dem Gang) und die uneingeschränkte Hilfe bei allen Problemen.

Ganz besonders der Marion und der Marija für ein offenes Ohr zu jeder Zeit.

Meinen Eltern und Großeltern für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich.

Dem Philipp. Für Alles.

10 Veröffentlichungen

HEINZELMANN, K.*, SCHOLZ, B. A.*, NOWAK, A., FOSSUM, E., KREMMER, E., HAAS, J., FRANK, R. & KEMPKES, B. 2010. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 4 (vIRF4/K10) is a novel interaction partner of CSL/CBF1, the major downstream effector of Notch signaling. *Journal of virology*, 84, 12255-64.

* shared first authorship

Literaturverzeichnis

- Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F. et al. (1990). Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol*, 64(5), 2126-2134.
- Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell* (5. ed.). New York [u.a.]: Garland Science.
- Allingham, J. S., Klenchin, V. A. & Rayment, I. (2006). Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci*, 63(18), 2119-2134.
- An, J., Totrov, M. & Abagyan, R. (2005). Pocketome via comprehensive identification and classification of ligand binding envelopes. *Mol Cell Proteomics*, 4(6), 752-761.
- An, W. F. & Tolliday, N. (2010). Cell-based assays for high-throughput screening. *Mol Biotechnol*, 45(2), 180-186.
- An, Z. (2010). Monoclonal antibodies - a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein Cell*, 1(4), 319-330.
- Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L. T. & Kwon, C. (2012). Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol*.
- Arkin, M. R., Randal, M., DeLano, W. L., Hyde, J., Luong, T. N., Oslob, J. D. et al. (2003). Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1603-1608.
- Artavanis-Tsakonas, S., Muskavitch, M. A. & Yedvobnick, B. (1983). Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(7), 1977-1981.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415), 770-776.
- Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J. M., Cohen, M. M. et al. (1977). Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer*, 19(1), 27-33.
- Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachi, J. et al. (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res*, 33(16), e137.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9), 678-689.
- Brower, E. T., Schon, A., Klein, J. C. & Freire, E. (2009). Binding thermodynamics of the N-terminal peptide of the CCR5 coreceptor to HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Biochemistry*, 48(4), 779-785.
- Buchwald, P. (2010). Small-molecule protein-protein interaction inhibitors: therapeutic potential in light of molecular size, chemical space, and ligand binding efficiency considerations. *IUBMB Life*, 62(10), 724-731.
- Calderwood, M. A., Lee, S., Holthaus, A. M., Blacklow, S. C., Kieff, E. & Johannsen, E. (2011). Epstein-Barr-Virus nuclear protein 3C binds to the N-terminal (NTD) and beta trefoil domains (BTD) of RBP/CSL; only the NTD interaction is essential for lymphoblastoid cell growth. *Virology*, 414(1), 19-25.
- Casella, J. F., Flanagan, M. D. & Lin, S. (1981). Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature*, 293(5830), 302-305.
- Chen, R., Zhang, D., Mao, Y., Zhu, J., Ming, H., Wen, J. et al. (2012). A Human Fab-Based Immunoconjugate Specific for the LMP1 Extracellular Domain Inhibits Nasopharyngeal Carcinoma Growth In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Ther*.

- Choquet, S., Oertel, S., LeBlond, V., Riess, H., Varoquaux, N., Dorken, B. et al. (2007). Rituximab in the management of post-transplantation lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation: proceed with caution. *Ann Hematol*, 86(8), 599-607.
- Chrencik, J. E., Patny, A., Leung, I. K., Korniski, B., Emmons, T. L., Hall, T. et al. (2010). Structural and thermodynamic characterization of the TYK2 and JAK3 kinase domains in complex with CP-690550 and CMP-6. *J Mol Biol*, 400(3), 413-433.
- Chung, C. N., Hamaguchi, Y., Honjo, T. & Kawauchi, M. (1994). Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res*, 22(15), 2938-2944.
- Cohen, J. I., Wang, F., Mannick, J. & Kieff, E. (1989). Epstein-Barr-Virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23), 9558-9562.
- Colas, P. (2008). High-throughput screening assays to discover small-molecule inhibitors of protein interactions. *Curr Drug Discov Technol*, 5(3), 190-199.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O. et al. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr-Virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol*, 64(3), 1002-1013.
- D'Souza, B., Miyamoto, A. & Weinmaster, G. (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene*, 27(38), 5148-5167.
- Del Bianco, C., Aster, J. C. & Blacklow, S. C. (2008). Mutational and energetic studies of Notch 1 transcription complexes. *J Mol Biol*, 376(1), 131-140.
- Del Bianco, C., Vedenko, A., Choi, S. H., Berger, M. F., Shokri, L., Bulyk, M. L. et al. (2010). Notch and MAML-1 complexation do not detectably alter the DNA binding specificity of the transcription factor CSL. *PLoS One*, 5(11), e15034.
- Diestel, R., Irschik, H., Jansen, R., Khalil, M. W., Reichenbach, H. & Sasse, F. (2009). Chivosazoles A and F, cytostatic macrolides from myxobacteria, interfere with actin. *Chembiochem*, 10(18), 2900-2903.
- Dobson, C. M. (2004). Chemical space and biology. *Nature*, 432(7019), 824-828.
- Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M. et al. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(11), 4721-4732.
- Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R. & Bishop, J. M. (1989). Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature*, 340(6228), 66-68.
- Ellmann, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M. W., Strick, R. & Strissel, P. L. (2009). Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci*, 66(15), 2405-2426.
- Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, 1(7335), 702-703.
- Espino, P. S., Li, L., He, S., Yu, J. & Davie, J. R. (2006). Chromatin modification of the trefoil factor 1 gene in human breast cancer cells by the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res*, 66(9), 4610-4616.
- Fahraeus, R., Jansson, A., Ricksten, A., Sjoblom, A. & Rymo, L. (1990). Epstein-Barr-Virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulating the activity of a negative regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(19), 7390-7394.
- Farrell, C. J., Lee, J. M., Shin, E. C., Cebrat, M., Cole, P. A. & Hayward, S. D. (2004). Inhibition of Epstein-Barr-Virus-induced growth proliferation by a nuclear antigen EBNA2-TAT peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13), 4625-4630.

- Flanagan, M. E., Blumenkopf, T. A., Brissette, W. H., Brown, M. F., Casavant, J. M., Shang-Poa, C. et al. (2010). Discovery of CP-690,550: a potent and selective Janus kinase (JAK) inhibitor for the treatment of autoimmune diseases and organ transplant rejection. *J Med Chem*, 53(24), 8468-8484.
- Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N. & Hillen, W. (1999). Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 27(2), 708-710.
- Fortini, M. E. (2009). Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell*, 16(5), 633-647.
- Fried, M. & Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, 9(23), 6505-6525.
- Friedmann, D. R., Wilson, J. J. & Kovall, R. A. (2008). RAM-induced allostery facilitates assembly of a notch pathway active transcription complex. *J Biol Chem*, 283(21), 14781-14791.
- Fryer, C. J., White, J. B. & Jones, K. A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell*, 16(4), 509-520.
- Fuchs, K. P., Bommer, G., Dumont, E., Christoph, B., Vidal, M., Kremmer, E. et al. (2001). Mutational analysis of the J recombination signal sequence binding protein (RBP-J)/Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2 (EBNA2) and RBP-J/Notch interaction. *Eur J Biochem*, 268(17), 4639-4646.
- Fuentes-Panana, E. M. & Ling, P. D. (1998). Characterization of the CBF2 binding site within the Epstein-Barr-Virus latency C promoter and its role in modulating EBNA2-mediated transactivation. *J Virol*, 72(1), 693-700.
- Fuentes-Panana, E. M., Peng, R., Brewer, G., Tan, J. & Ling, P. D. (2000). Regulation of the Epstein-Barr-Virus C promoter by AUF1 and the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. *J Virol*, 74(17), 8166-8175.
- Fuentes-Panana, E. M., Swaminathan, S. & Ling, P. D. (1999). Transcriptional activation signals found in the Epstein-Barr-Virus (EBV) latency C promoter are conserved in the latency C promoter sequences from baboon and Rhesus monkey EBV-like lymphocryptoviruses (cercopithecine herpesviruses 12 and 15). *J Virol*, 73(1), 826-833.
- Fuller, J. C., Burgoyne, N. J. & Jackson, R. M. (2009). Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface. *Drug Discov Today*, 14(3-4), 155-161.
- Furukawa, T., Kawaichi, M., Matsunami, N., Ryo, H., Nishida, Y. & Honjo, T. (1991). The Drosophila RBP-J kappa gene encodes the binding protein for the immunoglobulin J kappa recombination signal sequence. *J Biol Chem*, 266(34), 23334-23340.
- Ghoreschi, K., Laurence, A. & O'Shea, J. J. (2009). Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*, 228(1), 273-287.
- Goddette, D. W., Uberbacher, E. C., Bunick, G. J. & Frieden, C. (1986). Formation of actin dimers as studied by small angle neutron scattering. *J Biol Chem*, 261(6), 2605-2609.
- Gonzalez-Aguilar, A. & Soto-Hernandez, J. L. (2011). The management of primary central nervous system lymphoma related to AIDS in the HAART era. *Curr Opin Oncol*, 23(6), 648-653.
- Gordadze, A. V., Onunwor, C. W., Peng, R., Poston, D., Kremmer, E. & Ling, P. D. (2004). EBNA2 amino acids 3 to 30 are required for induction of LMP-1 and immortalization maintenance. *J Virol*, 78(8), 3919-3929.
- Gordadze, A. V., Poston, D. & Ling, P. D. (2002). The EBNA2 polyproline region is dispensable for Epstein-Barr-Virus-mediated immortalization maintenance. *J Virol*, 76(14), 7349-7355.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1), 59-74.
- Hagelueken, G., Albrecht, S. C., Steinmetz, H., Jansen, R., Heinz, D. W., Kalesse, M. et al. (2009). The absolute configuration of rhizopodin and its inhibition of actin polymerization by dimerization. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(3), 595-598.

- Hajduk, P. J., Huth, J. R. & Tse, C. (2005). Predicting protein druggability. *Drug Discov Today*, 10(23-24), 1675-1682.
- Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Yamamoto, Y. & Honjo, T. (1989). Purification and characterization of a protein that binds to the recombination signal sequence of the immunoglobulin J kappa segment. *Nucleic Acids Res*, 17(22), 9015-9026.
- Harada, S., Yalamanchili, R. & Kieff, E. (2001). Epstein-Barr-Virus nuclear protein 2 has at least two N-terminal domains that mediate self-association. *J Virol*, 75(5), 2482-2487.
- Hayward, S. D., Liu, J. & Fujimuro, M. (2006). Notch and Wnt signaling: mimicry and manipulation by gamma herpesviruses. *Sci STKE*, 2006(335), re4.
- Heinzelmann, K., Scholz, B. A., Nowak, A., Fossum, E., Kremmer, E., Haas, J. et al. (2010). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 4 (vIRF4/K10) is a novel interaction partner of CSL/CBF1, the major downstream effector of Notch signaling. *J Virol*, 84(23), 12255-12264.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J. et al. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*, 87(3), 905-931.
- Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, S. D. & Peterson, M. G. (1994). Mediation of Epstein-Barr-Virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science*, 265(5168), 92-95.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D. & Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr-Virus. *Annu Rev Immunol*, 25, 587-617.
- Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B. & Hayward, S. D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(1), 23-28.
- Hutt-Fletcher, L. M. (2007). Epstein-Barr-Virus entry. *J Virol*, 81(15), 7825-7832.
- Ilagan, M. X., Lim, S., Fulbright, M., Piwnica-Worms, D. & Kopan, R. (2011). Real-time imaging of notch activation with a luciferase complementation-based reporter. *Sci Signal*, 4(181), rs7.
- Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Hofle, G. & Reichenbach, H. (1995). Chivosazol A, a new inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria. *J Antibiot (Tokyo)*, 48(9), 962-966.
- Irschik, H., Schummer, D., Gerth, K., Hofle, G. & Reichenbach, H. (1995). The tartrolons, new boron-containing antibiotics from a myxobacterium, *Sorangium cellulosum*. *J Antibiot (Tokyo)*, 48(1), 26-30.
- Irschik, H., Trowitzsch-Kienast, W., Gerth, K., Hofle, G. & Reichenbach, H. (1988). Saframycin Mx1, a new natural saframycin isolated from a myxobacterium. *J Antibiot (Tokyo)*, 41(8), 993-998.
- Jagannathan, V. & Robinson-Rechavi, M. (2011). Meta-analysis of estrogen response in MCF-7 distinguishes early target genes involved in signaling and cell proliferation from later target genes involved in cell cycle and DNA repair. *BMC Syst Biol*, 5, 138.
- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E. & Grossman, S. R. (1995). Epstein-Barr-Virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol*, 69(1), 253-262.
- Johnson, S. E., Ilagan, M. X., Kopan, R. & Barrick, D. (2010). Thermodynamic analysis of the CSLxNotch interaction: distribution of binding energy of the Notch RAM region to the CSL beta-trefoil domain and the mode of competition with the viral transactivator EBNA2. *J Biol Chem*, 285(9), 6681-6692.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W. & Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2. *J Virol*, 73(5), 4481-4484.
- Kalinova, L., Indrakova, J. & Bachleda, P. (2009). Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 153(4), 251-257.

- Kannabiran, C., Zeng, X. & Vales, L. D. (1997). The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) regulates interleukin-6 gene expression. *Mol Cell Biol*, 17(1), 1-9.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R. et al. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev*, 12(15), 2269-2277.
- Kempkes, B. (2010). *EBNA-2 in Transkription Activation of Viral and Cellular Genes*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Kempkes, B., Pawlita, M., Zimber-Strobl, U., Eissner, G., Laux, G. & Bornkamm, G. W. (1995). Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. *Virology*, 214(2), 675-679.
- Kohler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497.
- Kojima, K., Burks, J. K., Arts, J. & Andreeff, M. (2010). The novel tryptamine derivative JNJ-26854165 induces wild-type p53- and E2F1-mediated apoptosis in acute myeloid and lymphoid leukemias. *Mol Cancer Ther*, 9(9), 2545-2557.
- Kopan, R. & Ilagan, M. X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), 216-233.
- Kovall, R. A. (2008). More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. *Oncogene*, 27(38), 5099-5109.
- Kovall, R. A. & Hendrickson, W. A. (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J*, 23(17), 3441-3451.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Chuang, G. Y., Cencic, R., Brenke, R., Grove, L. E. et al. (2011). Structural conservation of druggable hot spots in protein-protein interfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33), 13528-13533.
- Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Hofle, G. & Reichenbach, H. (1995). Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 48(11), 1262-1266.
- Kunze, B., Steinmetz, H., Hofle, G., Huss, M., Wieczorek, H. & Reichenbach, H. (2006). Cruentaren, a new antifungal salicylate-type macrolide from *Byssosvorax cruenta* (myxobacteria) with inhibitory effect on mitochondrial ATPase activity. Fermentation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 59(10), 664-668.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr-Virus. *Nat Rev Immunol*, 3(10), 801-812.
- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T. et al. (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity*, 18(2), 301-312.
- Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. J. et al. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274(5289), 948-953.
- Kutok, J. L. & Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr-Virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 375-404.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, E. C. (2002). Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep*, 3(9), 840-845.
- Lambie, E. J. & Kimble, J. (1991). Two homologous regulatory genes, *lin-12* and *glp-1*, have overlapping functions. *Development*, 112(1), 231-240.
- Laux, G., Adam, B., Strobl, L. J. & Moreau-Gachelin, F. (1994). The Spi-1/PU.1 and Spi-B ets family transcription factors and the recombination signal binding protein RBP-J kappa interact

- with an Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2 responsive cis-element. *EMBO J*, 13(23), 5624-5632.
- Levin, E. R. (2008). Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(5), R1425-1430.
- Liang, Y., Chang, J., Lynch, S. J., Lukac, D. M. & Ganem, D. (2002). The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev*, 16(15), 1977-1989.
- Ling, P. D., Rawlins, D. R. & Hayward, S. D. (1993). The Epstein-Barr-Virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20), 9237-9241.
- Ling, P. D., Ryon, J. J. & Hayward, S. D. (1993). EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr-Virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J Virol*, 67(6), 2990-3003.
- Lipinski, C. & Hopkins, A. (2004). Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*, 432(7019), 855-861.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3), 3-26.
- Lonning, P. E., Haynes, B. P., Straume, A. H., Dunbier, A., Helle, H., Knappskog, S. et al. (2011). Exploring breast cancer estrogen disposition: the basis for endocrine manipulation. *Clin Cancer Res*, 17(15), 4948-4958.
- Lubman, O. Y., Ilagan, M. X., Kopan, R. & Barrick, D. (2007). Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. *J Mol Biol*, 365(3), 577-589.
- Macarron, R. & Hertzberg, R. P. (2011). Design and implementation of high throughput screening assays. *Mol Biotechnol*, 47(3), 270-285.
- Maier, S., Santak, M., Mantik, A., Grabusic, K., Kremmer, E., Hammerschmidt, W. et al. (2005). A somatic knockout of CBF1 in a human B-cell line reveals that induction of CD21 and CCR7 by EBNA-2 is strictly CBF1 dependent and that downregulation of immunoglobulin M is partially CBF1 independent. *J Virol*, 79(14), 8784-8792.
- Maier, S., Staffler, G., Hartmann, A., Hock, J., Henning, K., Grabusic, K. et al. (2006). Cellular target genes of Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2. *J Virol*, 80(19), 9761-9771.
- Meitinger, C., Strobl, L. J., Marschall, G., Bornkamm, G. W. & Zimmer-Strobl, U. (1994). Crucial sequences within the Epstein-Barr-Virus TP1 promoter for EBNA2-mediated transactivation and interaction of EBNA2 with its responsive element. *J Virol*, 68(11), 7497-7506.
- Miele, L. (2006). Notch signaling. *Clin Cancer Res*, 12(4), 1074-1079.
- Morgan, T. H. (1911). The Origin of Nine Wing Mutations in *Drosophila*. *Science*, 33(848), 496-499.
- Mortensen, K. & Larsson, L. I. (2003). Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neoformed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 60(5), 1007-1012.
- Nair, U. B., Joel, P. B., Wan, Q., Lowey, S., Rould, M. A. & Trybus, K. M. (2008). Crystal structures of monomeric actin bound to cytochalasin D. *J Mol Biol*, 384(4), 848-864.
- Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J. C. & Blacklow, S. C. (2006). Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell*, 124(5), 973-983.
- Nam, Y., Weng, A. P., Aster, J. C. & Blacklow, S. C. (2003). Structural requirements for assembly of the CSL-intracellular Notch1-Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *J Biol Chem*, 278(23), 21232-21239.

- Neugebauer, A., Hartmann, R. W. & Klein, C. D. (2007). Prediction of protein-protein interaction inhibitors by chemoinformatics and machine learning methods. *J Med Chem*, 50(19), 4665-4668.
- O'Neil, J. & Look, A. T. (2007). Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene*, 26(47), 6838-6849.
- Oerlemans, S., Mols, F., Nijziel, M. R., Lybeert, M. & van de Poll-Franse, L. V. (2011). The impact of treatment, socio-demographic and clinical characteristics on health-related quality of life among Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma survivors: a systematic review. *Ann Hematol*, 90(9), 993-1004.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T. et al. (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development*, 121(10), 3291-3301.
- Olave, I., Reinberg, D. & Vales, L. D. (1998). The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) targets TFIID and TFIIA to prevent activated transcription. *Genes Dev*, 12(11), 1621-1637.
- Oswald, F., Kostezka, U., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Dillinger, K., Zechner, U. et al. (2002). SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J*, 21(20), 5417-5426.
- Oswald, F., Liptay, S., Adler, G. & Schmid, R. M. (1998). NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol*, 18(4), 2077-2088.
- Peti, W. & Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost. *Protein Expr Purif*, 51(1), 1-10.
- Picard, D., Salser, S. J. & Yamamoto, K. R. (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell*, 54(7), 1073-1080.
- Plaisance, S., Vanden Berghe, W., Boone, E., Fiers, W. & Haegeman, G. (1997). Recombination signal sequence binding protein Jkappa is constitutively bound to the NF-kappaB site of the interleukin-6 promoter and acts as a negative regulatory factor. *Mol Cell Biol*, 17(7), 3733-3743.
- Pratt, W. B. & Toft, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228(2), 111-133.
- Pursglove, S. E. & Mackay, J. P. (2005). CSL: a notch above the rest. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(12), 2472-2477.
- Rae, J. M., Johnson, M. D., Scheys, J. O., Cordero, K. E., Larios, J. M. & Lippman, M. E. (2005). GREB 1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Res Treat*, 92(2), 141-149.
- Robertson, E. S., Lin, J. & Kieff, E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr-Virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol*, 70(5), 3068-3074.
- Rooney, C., Howe, J. G., Speck, S. H. & Miller, G. (1989). Influence of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr-Virus. *J Virol*, 63(4), 1531-1539.
- Saha, A. & Robertson, E. S. (2011). Epstein-Barr-Virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin Cancer Res*, 17(10), 3056-3063.
- Saha, M. N., Micallef, J., Qiu, L. & Chang, H. (2010). Pharmacological activation of the p53 pathway in haematological malignancies. *J Clin Pathol*, 63(3), 204-209.
- Sanalkumar, R., Dhanesh, S. B. & James, J. (2010). Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell Mol Life Sci*, 67(17), 2957-2968.
- Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, T. M. & Reichenbach, H. (1998). The chondramides: cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst*, 90(20), 1559-1563.
- Sasse, F., Steinmetz, H., Heil, J., Hofle, G. & Reichenbach, H. (2000). Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 53(9), 879-885.

- Sasse, F., Steinmetz, H., Hofle, G. & Reichenbach, H. (1993). Rhizopodin, a new compound from *Mycococcus stipitatus* (myxobacteria) causes formation of rhizopodia-like structures in animal cell cultures. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 46(5), 741-748.
- Sasse, F., Steinmetz, H., Hofle, G. & Reichenbach, H. (1995). Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukaryotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)*, 48(1), 21-25.
- Schleicher, M. & Jockusch, B. M. (2008). Actin: its cumbersome pilgrimage through cellular compartments. *Histochem Cell Biol*, 129(6), 695-704.
- Schmauder, A., Sibley, L. D. & Maier, M. E. (2010). Total synthesis and configurational assignment of chondramide A. *Chemistry*, 16(14), 4328-4336.
- Schoenenberger, C. A., Mannherz, H. G. & Jockusch, B. M. (2011). Actin: from structural plasticity to functional diversity. *Eur J Cell Biol*, 90(10), 797-804.
- Schummer, D., Forche, E., Wray, V., Domke, T., Reichenbach, H. & Höfle, G. (1996). Vioprolides: New Antifungal and Cytotoxic Peptolides from *Cystobacter violaceus*. *Liebigs Annalen*, 1996(6), 971-978.
- Shanle, E. K. & Xu, W. (2010). Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(13), 1265-1276.
- Shin, H. M., Minter, L. M., Cho, O. H., Gottipati, S., Fauq, A. H., Golde, T. E. et al. (2006). Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. *EMBO J*, 25(1), 129-138.
- Shin, J. S., Ha, J. H., He, F., Muto, Y., Ryu, K. S., Yoon, H. S. et al. (2012). Structural insights into the dual-targeting mechanism of Nutlin-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 420(1), 48-53.
- Siemer, D., Kurth, J., Lang, S., Lehnerdt, G., Stanelle, J. & Kuppers, R. (2008). EBV transformation overrides gene expression patterns of B cell differentiation stages. *Mol Immunol*, 45(11), 3133-3141.
- Simoncini, T., Scorticati, C., Mannella, P., Fadiel, A., Giretti, M. S., Fu, X. D. et al. (2006). Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol*, 20(8), 1756-1771.
- Sittampalam, G. S., Kahl, S. D. & Janzen, W. P. (1997). High-throughput screening: advances in assay technologies. *Curr Opin Chem Biol*, 1(3), 384-391.
- Slack, G. W. & Gascoyne, R. D. (2011). MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol*, 18(3), 219-228.
- Smith, C., Tsang, J., Beagley, L., Chua, D., Lee, V., Li, V. et al. (2012). Effective Treatment of Metastatic Forms of Epstein-Barr-Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma with a Novel Adenovirus-Based Adoptive Immunotherapy. *Cancer Res*.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51(5), 1409-1416.
- Steinmetz, H., Glaser, N., Herdtweck, E., Sasse, F., Reichenbach, H. & Hofle, G. (2004). Isolation, crystal and solution structure determination, and biosynthesis of tubulysins--powerful inhibitors of tubulin polymerization from myxobacteria. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43(37), 4888-4892.
- Sudbeck, E. A., Liu, X. P., Narla, R. K., Mahajan, S., Ghosh, S., Mao, C. et al. (1999). Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin Cancer Res*, 5(6), 1569-1582.
- Taiyab, A. & Rao Ch, M. (2011). HSP90 modulates actin dynamics: inhibition of HSP90 leads to decreased cell motility and impairs invasion. *Biochim Biophys Acta*, 1813(1), 213-221.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. et al. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol*, 5(12), 1416-1423.

- Tannenbaum, J., Tanenbaum, S. W., Lo, L. W., Godman, G. C. & Miranda, A. F. (1975). Binding and subcellular localization of tritiated cytochalasin D. *Exp Cell Res*, 91(1), 47-56.
- Thorley-Lawson, D. A. (2005). EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol*, 116(2), 251-261; quiz 262.
- Thorley-Lawson, D. A. & Allday, M. J. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol*, 6(12), 913-924.
- Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D. & Kieff, E. (1995). The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIH mediate the interaction with Epstein-Barr-Virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3259-3263.
- Tong, X., Yalamanchili, R., Harada, S. & Kieff, E. (1994). The EBNA-2 arginine-glycine domain is critical but not essential for B-lymphocyte growth transformation; the rest of region 3 lacks essential interactive domains. *J Virol*, 68(10), 6188-6197.
- Tsui, S. & Schubach, W. H. (1994). Epstein-Barr-Virus nuclear protein 2A forms oligomers in vitro and in vivo through a region required for B-cell transformation. *J Virol*, 68(7), 4287-4294.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T. & Kawaichi, M. (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res*, 22(6), 965-971.
- Tuncbag, N., Keskin, O. & Gursoy, A. (2010). HotPoint: hot spot prediction server for protein interfaces. *Nucleic Acids Res*, 38(Web Server issue), W402-406.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H. & Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 7963-7968.
- Vales, L. D. & Friedl, E. M. (2002). Binding of C/EBP and RBP (CBF1) to overlapping sites regulates interleukin-6 gene expression. *J Biol Chem*, 277(45), 42438-42446.
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z. et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303(5659), 844-848.
- Waldmann, H., Hu, T. S., Renner, S., Menninger, S., Tannert, R., Oda, T. et al. (2008). Total synthesis of chondramide C and its binding mode to F-actin. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(34), 6473-6477.
- Walters, W. P., Ajay & Murcko, M. A. (1999). Recognizing molecules with drug-like properties. *Curr Opin Chem Biol*, 3(4), 384-387.
- Wang, F., Petti, L., Braun, D., Seung, S. & Kieff, E. (1987). A bicistronic Epstein-Barr-Virus mRNA encodes two nuclear proteins in latently infected, growth-transformed lymphocytes. *J Virol*, 61(4), 945-954.
- Wang, Z., Li, Y. & Sarkar, F. H. (2010). Notch signaling proteins: legitimate targets for cancer therapy. *Curr Protein Pept Sci*, 11(6), 398-408.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C. et al. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 306(5694), 269-271.
- Whitty, A. & Kumaravel, G. (2006). Between a rock and a hard place? *Nat Chem Biol*, 2(3), 112-118.
- Wilson, J. J. & Kovall, R. A. (2006). Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell*, 124(5), 985-996.
- Yang, L., Lu, Z., Ma, X., Cao, Y. & Sun, L. Q. (2010). A therapeutic approach to nasopharyngeal carcinomas by DNAzymes targeting EBV LMP-1 gene. *Molecules*, 15(9), 6127-6139.
- Young, L. S. & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr-Virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 757-768.
- Zecchini, V., Brennan, K. & Martinez-Arias, A. (1999). An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol*, 9(9), 460-469.

- Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 4(2), 67-73.
- Zhang, M. Q. & Wilkinson, B. (2007). Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Curr Opin Biotechnol*, 18(6), 478-488.
- Zhao, B., Marshall, D. R. & Sample, C. E. (1996). A conserved domain of the Epstein-Barr-Virus nuclear antigens 3A and 3C binds to a discrete domain of Jkappa. *J Virol*, 70(7), 4228-4236.
- Zhao, B., Zou, J., Wang, H., Johannsen, E., Peng, C. W., Quackenbush, J. et al. (2011). Epstein-Barr-Virus exploits intrinsic B-lymphocyte transcription programs to achieve immortal cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(36), 14902-14907.
- Zhao, R. & Houry, W. A. (2005). Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem Cell Biol*, 83(6), 703-710.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L. & Hayward, S. D. (2000). A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol*, 74(4), 1939-1947.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G. et al. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function. *Mol Cell Biol*, 20(7), 2400-2410.
- Zimber-Strobl, U. & Strobl, L. J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr-Virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol*, 11(6), 423-434.
- Zimber-Strobl, U., Strobl, L. J., Meitinger, C., Hinrichs, R., Sakai, T., Furukawa, T. et al. (1994). Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *EMBO J*, 13(20), 4973-4982.
- Zolkiewska, A. (2008). ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. *Cell Mol Life Sci*, 65(13), 2056-2068.