

4 Summary / Zusammenfassung

The objective of this PhD project was to investigate regulation of T cell receptor (TCR) dependent Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) activation by the Carma1/Bcl10/Malt1 complex. Triggering of the T cell receptor is critical for initiating the adaptive immune response against pathogens. Since T cells play a crucial role in orchestrating the immune response, a detailed knowledge of TCR signaling is pivotal for understanding aberrant T or B cell responses in autoimmunity or cancer. The transcription factor NF- κ B triggers the expression of many target genes involved in antigen-specific proliferation, differentiation and survival of T cells, thus representing a central mediator of T cell activation. At a molecular level, the I κ B kinase (IKK) complex represents the gatekeeper of NF- κ B activation in many pathways including TCR signaling. The IKK complex phosphorylates inhibitors of NF- κ B (I κ Bs), which leads to their proteasomal degradation and translocation of NF- κ B to the nucleus. In T cells, formation of a Carma1/Bcl10/Malt1 (CBM) complex was shown to be essential for IKK activation. However, the molecular mechanisms, which connect CBM complex formation to IKK activation, had remained elusive.

In the presented work Malt1 was identified as a novel target for regulatory ubiquitination in the course of TCR signaling. Malt1 ubiquitination is transient and correlates with NF- κ B activation. The ubiquitin ligase TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) was shown to associate with Malt1 in a stimulus-dependent manner and to mediate Malt1 ubiquitination *in vitro* and *in vivo* by attachment of lysine 63-linked ubiquitin chains to multiple lysine residues in the Malt1 C-terminus. Through RNAi evidence and the finding that the TRAF6 binding sites in Malt1 are required for NF- κ B and T cell activation, the presented work strongly supports a critical role for TRAF6 in TCR signaling to NF- κ B. By reconstitution experiments using Malt1 deficient primary T cells, a crucial function for C-terminal Malt1 ubiquitination in NF- κ B and T cell activation could be demonstrated. Finally, Malt1-attached ubiquitin chains were shown to provide the interaction surface for recruitment of the regulatory IKK complex component IKK γ . IKK γ associates with ubiquitinated Malt1 upon TCR engagement and this interaction critically depends on the ubiquitin-binding motif of IKK γ . Furthermore, binding of ubiquitin chains by IKK γ was demonstrated to be essential for TCR triggered NF- κ B activation. Based on the presented findings, a new model for CBM dependent IKK activation can be suggested: Upon CBM complex formation, TRAF6 associates with the C-terminus of Malt1 and mediates ubiquitination of multiple lysines in the vicinity. IKK γ is then recruited to ubiquitin-chains attached to Malt1, what could either induce IKK complex

activation by induced proximity or by recruitment of an IKK activating kinase. Both mechanisms are not mutually exclusive and await further investigation. Thus, Malt1 ubiquitination represents the missing link between IKK and CBM complexes, thereby directing TCR proximal signals to IKK activation. The presented results provide a major advance in our understanding of TCR signaling and demonstrate the fundamental importance of regulatory ubiquitination in signaling processes.

In addition, a second, ubiquitin-like protein modification was investigated in this thesis. It was demonstrated that Bcl10 can be a target of sumoylation and that attachment of SUMO occurs specifically at lysine 110. This modification does not seem to be involved in TCR signaling. The presented data suggest an interplay between Bcl10 sumoylation and subcellular localization. Sumoylation is enhanced upon nuclear localization of Bcl10 and SUMO fusion to Bcl10 leads to its nuclear import and retention. Furthermore, Bcl10-SUMO fusion results in an enhanced NF- κ B activation potential compared to wildtype Bcl10. This represents a characteristic feature of Bcl10-SUMO fusion since nuclear localization of Bcl10 mediated by a nuclear localization sequence (NLS) or SUMO alone could not provoke NF- κ B activity. Aberrant nuclear localization of Bcl10 is observed in many MALT lymphomas, which critically depend on constitutive NF- κ B activation, and correlates with advanced stages. The molecular mechanisms underlying this phenomenon are poorly understood. Thus, sumoylation could represent a novel mechanism to mediate nuclear localization of Bcl10. Additionally, the data suggest that sumoylation of nuclear Bcl10 could influence NF- κ B activity by a yet uncharacterized mechanism. Further studies are now required to confirm the existence and role of sumoylated Bcl10 under physiological or pathological conditions.

Zielsetzung dieser Doktorarbeit war eine Beschreibung der Funktion des Carma1/Bcl10/Malt1 Proteinkomplexes für die Signalvermittlung vom stimulierten T-Zell-Rezeptor zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear factor- κ B). Die Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TZR) durch Pathogene führt zur Einleitung einer spezifischen Immunantwort, in deren Koordination T-Zellen eine zentrale Rolle einnehmen. Ein detailliertes Wissen über die vom T-Zell-Rezeptor induzierten Signalprozesse bildet daher die Basis für unser Verständnis von abnormalem B- und T-Zell-Verhalten bei Autoimmun- oder Krebserkrankungen. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert eine Vielzahl von Zielgenen, die für Vermehrung, Differenzierung und Überleben von T-Zellen entscheidend sind, und stellt daher einen wichtigen Faktor für die T-Zell-Aktivierung dar. Auf molekularer Ebene repräsentiert der I κ B Kinase (IKK) Komplex die zentrale Schaltstelle der NF- κ B Signalkaskade. Die katalytisch aktiven Kinasen dieses Komplexes induzieren durch Phosphorylierung die Degradation von NF- κ B-Inhibitorproteinen (I κ B) und steuern so die Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Für T-Zellen wurde gezeigt, dass die Formierung eines Carma1/Bcl10/Malt1 (CBM) Komplexes entscheidend für die Aktivierung des IKK Komplexes ist. Die molekularen Mechanismen, die eine Weiterleitung des Signals vom CBM zum IKK Komplex steuern, sind allerdings bisher weitgehend unverstanden.

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde Malt1 als neues Substrat für regulative Ubiquitinierung in der T-Zell-Rezeptor Signalkaskade identifiziert. Die Ubiquitinierung von Malt1 ist transient und korreliert zeitlich mit der Aktivierung des NF- κ B Signalweges. Es konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitin-Ligase TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) nach T-Zell-Stimulation mit Malt1 assoziiert und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Ubiquitinierung von Malt1 vermitteln kann. Dabei werden mehrere Lysine im C-terminalen Teil von Malt1 mit über Lysin-63 vernetzten Ubiquitin-Ketten modifiziert. Studien mit siRNAs und der Befund, dass die TRAF6 Bindungsstellen in Malt1 für NF- κ B und T-Zell-Aktivierung benötigt werden, weisen auf eine entscheidende Rolle von TRAF6 in der T-Zell-Rezeptor Signalkaskade hin. Rekonstitutionsexperimente mit primären T-Zellen konnten eine essentielle Funktion der C-terminalen Malt1 Ubiquitinierung für NF- κ B und T-Zell Aktivierung nachweisen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die an Malt1 gebundenen Ubiquitin-Ketten eine molekulare Interaktionsoberfläche für die Rekrutierung der regulatorischen IKK Komplex Untereinheit IKK γ darstellen. Nach TZR-Stimulation bindet IKK γ ubiquitiniertes Malt1, wobei diese Interaktion von dem Ubiquitin-Bindungsmotiv in IKK γ vermittelt wird. Durch Mutation des Ubiquitin-Bindungsmotivs konnte demonstriert werden, dass diese Proteindomäne in IKK γ für die NF- κ B Aktivierung in T-Zellen essentiell ist. Basierend auf

diesen Ergebnissen kann ein neues Modell für die CBM induzierte IKK Aktivierung vorgeschlagen werden: Nach Bildung des CBM Komplexes assoziiert TRAF6 mit dem C-Terminus von Malt1 und bewirkt die Ubiquitinierung von Lysinen in der Nähe der Bindungsstelle. Die gebildeten Ubiquitin-Ketten führen dann zu einer über das Ubiquitin-Bindungsmotiv in IKK γ vermittelten Rekrutierung des IKK Komplexes. Dies könnte durch induzierte Nähe die Autoaktivierung des IKK Komplexes oder die Rekrutierung einer IKK aktivierenden Kinase verursachen. Beide Szenarien schließen sich nicht gegenseitig aus und weitere Studien sind erforderlich, um den exakten Mechanismus zu analysieren. Die Ubiquitinierung von Malt1 stellt folglich die bisher unbekannt Verbindung zwischen CBM und IKK Komplexen dar und leitet so vom TZR initiierte Signale an den IKK Komplex weiter. Die vorgestellten Daten repräsentieren somit einen grundlegenden Fortschritt unseres Verständnisses der vom TZR induzierten Signalkaskade und zeigen die fundamentale Bedeutung von regulativer Ubiquitinierung in Signalprozessen.

Zusätzlich wurde im Zuge dieser Doktorarbeit eine zweite der Ubiquitinierung ähnliche Proteinmodifikation untersucht. Es wurde gezeigt, dass Bcl10 durch Sumoylierung an Lysin 110 modifiziert werden kann. Diese posttranslationale Modifikation scheint jedoch keine Rolle in der TZR induzierten Signalkaskade zu spielen. Die präsentierten Daten belegen vielmehr ein Zusammenspiel von Sumoylierung und intrazellulärer Lokalisation von Bcl10, wobei eine nukleäre Bcl10 Lokalisation die Sumoylierung fördert. Eine Fusion von SUMO und Bcl10 wiederum resultiert in einer Akkumulation des Proteins im Zellkern. Des Weiteren führt die Expression eines Bcl10-SUMO Fusionsproteins zu einer im Vergleich zu Bcl10 verstärkten NF- κ B Aktivierung. Dieser Effekt wird spezifisch von Bcl10-SUMO vermittelt, da nukleäre Bcl10 Lokalisation oder SUMO alleine keine NF- κ B Aktivierung hervorrufen. Eine abnormale Lokalisation von Bcl10 im Zellkern wurde in vielen Malt Lymphomen beobachtet und korreliert mit fortgeschrittenen Lymphomstadien. Eine konstitutive NF- κ B Aktivität ist charakteristisch für diese MALT Lymphome. Da die molekularen Mechanismen, die zu nukleärer Bcl10 Lokalisation führen, kaum verstanden sind, könnte die Sumoylierung von Bcl10 einen bisher unerkannten Mechanismus repräsentieren, der diese vermittelt. Außerdem deuten die vorgestellten Daten darauf hin, dass nukleäre Bcl10 Sumoylierung die NF- κ B Aktivität über einen noch unbekannt Mechanismus beeinflussen könnte. Zukünftige Experimente müssen nun die Existenz und Funktion von sumoyliertem Bcl10 unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen nachweisen.