



Biochemische Untersuchung der Phosphorylierungsmuster im Transkriptionszyklus der RNA Polymerase II

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät Chemie an der Technischen Universität Dortmund

angefertigt am
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund,
und dem
center of advanced european studies and research (caesar), Bonn

vorgelegt von
M.Sc. Ann Katrin Greifenberg
geboren am 26.01.1987 in Bochum

Dortmund, September 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2011 bis März 2013 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von PD Dr. Matthias Geyer und April 2013 bis September 2014 am center of advanced european studies and research (caesar) unter der Leitung von PD Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Abkürzungsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
Formelverzeichnis.....	x
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	3
2.1 HIV und Krebs	3
2.2 Die Organisation der DNA in Zellen.....	5
2.3 Die Transkription in Eukaryoten.....	7
2.3.1 Der Transkriptionszyklus	8
2.3.2 Die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II	10
2.4 Transkriptionsregulierende Kinasen.....	15
2.4.1 Strukturelle Eigenschaften von Kinasen.....	17
2.4.2 Erk1 und Erk2.....	19
2.4.3 Cdk12/CycK und Cdk13/CycK.....	20
2.4.4 CdkF/CycH.....	21
2.4.5 c-Abl.....	22
2.4.6 Spleißkinasen und -faktoren	23
2.5 Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb)	25
2.5.1 Inhibition durch Hexim	26
2.5.2 Aktivierung von P-TEFb durch Brd4	27
2.5.3 Das HIV Protein Tat.....	29
2.5.4 Der Superelongationskomplex: Einfluss von AFF4 auf die Transkription.....	30
2.6 c-Myc als Transkriptionsfaktor	31
2.7 Zielsetzung	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Material.....	34
3.1.1 Feinchemikalien.....	34
3.1.2 Nukleotide	34
3.1.3 Kits	34
3.1.4 Größenstandards	35
3.1.5 Sonstige Chemikalien	35
3.1.6 Mikroorganismen und Zellstämme	36
3.1.7 DNA-Konstrukte	36
3.1.8 Enzyme	37
3.1.9 Antikörper.....	37

3.1.10	Synthetische Peptide	38
3.1.11	Materialien für eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie	39
3.1.12	Chromatographiematerialien.....	41
3.1.13	Laborgeräte und Zubehör.....	41
3.1.14	Häufig verwendete Lösungen und Puffer.....	43
3.2	Molekularbiologische Methoden	45
3.2.1	Elektrokompetente Zellen	45
3.2.2	Polymerasekettenreaktion	45
3.2.3	Agarosegelelektrophorese.....	46
3.2.4	Restriktionsverdau	46
3.2.5	Ligation	47
3.2.6	Transformation von Bakterien	47
3.2.7	DNA-Sequenzierung.....	47
3.2.8	<i>In vitro</i> Synthese von RNAs	47
3.2.9	Herstellung von Multigen-Expressionskassetten per Cre-loxP-Reaktion	48
3.2.10	Transposition des Transfervektors in das baculo-virale Genom	48
3.3	Zellbiologische Methoden.....	49
3.3.1	Transformation und Transposition	49
3.3.2	Isolation rekombinanter Bacmid-DNA	49
3.3.3	Kultivierung von <i>Sf21</i> Zellen	50
3.3.4	Transfektion von <i>Sf21</i> Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA	50
3.3.5	Virusamplifikation	50
3.4	Biochemische Methoden.....	51
3.4.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	51
3.4.2	Proteinexpression in <i>Sf21</i> oder <i>Sf9</i> -Insektenzellen	51
3.4.3	Isotopenmarkierte Proteinexpression in <i>E. coli</i>	51
3.4.4	Zellaufschluss.....	52
3.4.5	Rückfaltung von Proteinen.....	52
3.4.6	Affinitätschromatographie	52
3.4.7	Ionenaustauschchromatographie	53
3.4.8	Konzentrierung von Proteinproben	54
3.4.9	Dialyse von Proteinproben.....	54
3.4.10	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	54
3.4.11	Präparative Größenausschlusschromatographie.....	55
3.4.12	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	55
3.4.13	Western Blot	56
3.4.14	Analytische Größenausschlusschromatographie.....	58
3.4.15	Massenspektrometrie	58
3.4.16	Kinaseassays	59
3.5	Biophysikalische Methoden.....	61
3.5.1	Isothermale Titrationskalorimetrie	61
3.5.2	CD Spektroskopie	62

4	Ergebnisse.....	64
4.1	Darstellung, Aktivierung und Analyse von Erk1 und Erk2	64
4.1.1	Erk1 und Erk2 als CTD Kinasen und deren Inhibition.....	66
4.1.2	Substratspezifität von Erk.....	69
4.1.3	Richtungsabhängigkeit der Phosphorylierungsreaktion von Erk.....	78
4.2	Transkriptionsregulierende Kinasen.....	79
4.2.1	CdkF.....	80
4.2.2	Dsk1 und SRPK2.....	86
4.3	Funktionelle Untersuchungen der Regulation von P-TEFb durch Cofaktoren.....	89
4.3.1	Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 PID.....	89
4.3.2	Vergleichende Analyse zum Einfluss von Brd4 und HIV-1 Tat auf P-TEFb.....	94
4.3.3	Analyse der Substratspezifität von Brd4 PID aktiviertem P-TEFb	96
4.3.4	Brd4 als atypische Kinase.....	100
4.3.5	Einfluss des zellulären Cofaktors AFF4	101
4.4	Darstellung neuer Cdk-Inhibitoren	109
4.4.1	Cdk und Cyclin Alignments	110
4.4.2	Darstellung und Struktur von Cdk13/CycK und Cdk12/CycK.....	112
4.4.3	Inhibition der transkriptionsregulierenden Kinasen durch Flavopiridol.....	120
4.4.4	Analyse der Inhibition von Transkriptionselongationskinasen.....	122
4.5	c-Abl und Pin1	127
4.6	c-Myc als Substrat Transkriptionsregulierender Kinasen	129
5	Diskussion und Ausblick	134
5.1	Substratspezifität und Regulation verschiedener Kinasen	134
5.2	Die Generierung eines 'CTD-Codes'	150
5.3	Inhibitoren der Transkriptionselongationskinasen.....	155
5.4	Krankheitsbezug.....	158
6	Literaturverzeichnis	161
	Danksagung.....	187
	Eidesstattliche Erklärung	189

Abkürzungsverzeichnis

3C	PreScission (Protease)
7-methyl-GpppA	7-Methylguanosine 5' triphosphate Adenosine
Å	Ångström (10^{-10} m)
ADP	Adenosindiphosphat
AFF	AF4/FMR2-Familie
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (engl.: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
al.	lat.: alii
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AppNHp	Adenylylimidodiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	Arginin-reiches Motif
ATP	Adenosintriophosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
b/HLH/Z	engl.: <i>Basic/Helix-Loop-Helix/Leucin Zipper Motif</i>
BAC	engl.: <i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar
BD	Bromodomäne
BET-Familie	Protein-Familie mit Bromodomänen und einer ET-Domäne
Brd4	Bromodomänen-enhaltendes Protein 4
CAK	Cdk-aktivierende Kinase (engl.: <i>Cdk-activating Kinase</i>)
CD	Circular Dichroismus
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (engl.: <i>cyclin dependent kinase</i>)
ChiP	Chromatin Immunopräzipitation
cons.	consensus
cpm	Zählimpulse pro Minute (engl.: <i>counts per minutes</i>)
CT	C-terminale Domäne von Brd4
CTD	Carboxy-terminale Domäne
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cyc	Cyclin
ΔG	Änderung der Gibb'schen freien Energie
ΔH	Änderung der Enthalpie
ΔS	Änderung der Entropie
Da	Dalton
DDR	DNA Schäden (engl.: <i>DNA damage response</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside
DSIF	DRB-Sensitivität induzierender Faktor
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithioerythrit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELL	engl.: <i>eleven-nineteen Lys-rich leukaemia</i>
ENL	engl.: <i>eleven-nineteen leukemia</i>
Erk	extrazelluläre Signal regulierende Kinase
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTF	genereller Transkriptionsfaktor

GTP	Guanosintriphosphat
H3/H4	Histon 3 bzw. Histon 4
HAT	Histon-Acetyltransferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-2-ethanesulfonic Acid
Hexim1	Hexamethylene Bis-acetamide induzierbares Protein 1
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographiesystem (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie (engl.: <i>isothermal titration calorimetry</i>)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
k _{cat}	Wechselzahl
K _d	Dissoziationskonstante
k _{m(app)}	(apparente) Michaeliskonstante
Larp7	La-verwandtes Protein 7 (engl.: <i>La-related protein 7</i>)
LB	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LMW	engl.: <i>low molecular weight marker</i>
MAP	Mitogen aktiviertes Protein (engl.: <i>mitogen-activated protein</i>)
MePCE	Methylphosphat-Cappingenzym
Mg	Magnesium
MLL	engl.: <i>mixed lineage leukaemia</i>
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
n	Stöchiometrie einer Bindung
Nef	negativer Faktor (engl.: <i>negative factor</i>)
NELF	NELF negativer Elongationsfaktor
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (engl.: <i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>)
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
PAFc	engl.: <i>polymerase-associated factor complex</i>
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PIC	Präinitiationskomplex (engl.: <i>preinitiation complex</i>)
PID	engl.: <i>P-TEFb interacting domain</i>
Pin1	engl.: <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>
Plk	engl.: <i>polo-like kinase</i>
PMF	engl.: <i>peptide mass fingerprinting</i>
pSer	Phosphoserin
pThr	Phosphothreonin
pTyr	Phosphotyrosin
P-TEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b (Cdk9/CycT1)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAP	RNA-Polymerase
Rpb	RNA Pol II Untereinheit (engl.: <i>RNA Pol II subunit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RRM	engl.: <i>RNA recognition motif</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Superelongationskomplexen (engl.: <i>super elongation complex</i>)
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure (engl.: <i>small nuclear ribonucleic acid</i>)
snRNP	engl.: <i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAR	engl.: <i>trans-activation response element</i>
Tat	Transaktivator der Transkription
TBD	Cyclin T1 Bindungsdomäne
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEV	engl.: <i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIF	Triisopropylsilan
TOF	Flugzeit (engl.: <i>time of flight</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: <i>trifluoroacetic acid</i>)
T _m	Schmelztemperatur (engl.: <i>melting temperature</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRM	engl.: <i>Tat/TAR recognition motif</i>
tRNA	Transfer-RNAs
TSS	Transkriptionsstartstelle
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt. Aminosäuren wurden gemäß den Empfehlungen der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB) mit Ein- und Dreibuchstabencodes abgekürzt (IUPAC-IUB, 1968).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Darstellung von der Zelle zur DNA	6
Abbildung 2.2:	Überblick über den Informationsfluss von DNA über RNA zum Protein in Eukaryoten	7
Abbildung 2.3:	Schematische Darstellung des Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II	10
Abbildung 2.4:	Schematische Darstellung der C-terminalen Domäne (CTD) von RNAP II	11
Abbildung 2.5:	Posttranslationale Modifikationen der CTD	12
Abbildung 2.6:	Phosphorylierungsmuster der RNAP II CTD während des Transkriptionszyklus	14
Abbildung 2.7:	Consensus Sequenz der CTD mit den relevanten Kinasen und Phosphatasen	15
Abbildung 2.8:	Übersicht über das humane Kinom	16
Abbildung 2.9:	Kristallstruktur von Cdk2/CycA mit ADP•MgF ₃ •zwei Mg ²⁺ und Substrat-Rekrutierungspeptid	18
Abbildung 2.10:	Modell für die SR-abhängige Transkription im Vergleich zu Tat	24
Abbildung 2.11:	Inhibierung und Aktivierung von P-TEFb	28
Abbildung 2.12:	Der Superelongationskomplex	31
Abbildung 2.13:	Übersicht und Zusammenhänge der verwendeten Proteine	33
Abbildung 4.1:	Charakterisierung der humanen Kinasen Erk1 und Erk2	65
Abbildung 4.2:	Aktivität von Erk1 und Erk2	66
Abbildung 4.3:	Bestimmung der Phosphorylierungsanzahl der CTD durch Erk1	68
Abbildung 4.4:	Design der CTD Substratpeptide	70
Abbildung 4.5:	Bestimmung der Substratspezifität von Erk1	71
Abbildung 4.6:	Kinetiken der Erk vermittelten Phosphorylierung auf verschiedenen CTD-Peptiden	73
Abbildung 4.7:	Western Blots der Erk1 abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD _[52]	74
Abbildung 4.8:	Western Blots der p38-gamma abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD _[52]	76
Abbildung 4.9:	Western Blots der p38-delta abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD _[52]	77
Abbildung 4.10:	Erk1 Aktivität auf teilweise vorphosphorylierte CTD Substraten über die Zeit	78
Abbildung 4.11:	Proteincharakterisierung der gereinigten CdkF Kinase	81
Abbildung 4.12:	Charakterisierung der CdkF vermittelten Phosphorylierung der CTD	82
Abbildung 4.13:	ESI-MS-Spektren der CTD-Peptide cons. CTD _[3] , pS2-CTD _[3] , pS5-CTD _[3] , pS7-CTD _[3] vor und nach 3 stündiger Inkubation mit CdkF	84
Abbildung 4.14:	Western Blots der CdkF abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD _[52]	85
Abbildung 4.15:	Charakterisierung der Dsk1 und SRPK2 vermittelten Phosphorylierung der CTD und der P-TEFb vermittelten Phosphorylierung des SRSFII Proteins	87
Abbildung 4.16:	Western Blots der Dsk1 abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD _[52]	88
Abbildung 4.17:	Domänenesign der verwendeten Brd4 Konstrukte und Analyse dieser Regionen auf die P-TEFb Aktivität	90
Abbildung 4.18:	Kinetiken der Brd4 PID stimulierenden P-TEFb Aktivität	92
Abbildung 4.19:	ITC Messungen zur Charakterisierung der Bindung von Brd4 PID an P-TEFb	93
Abbildung 4.20:	Sequenzübereinstimmungen von Brd4 und Tat mit anschließender Analyse von mutierten Sequenzmotiven in Brd4 und Tat	94
Abbildung 4.21:	Substratspezifität von P-TEFb in Gegenwart von Brd4 PID für vorphosphorylierte CTD Substrate	97
Abbildung 4.22:	Substratspezifität und Richtungsabhängigkeit von P-TEFb in Gegenwart von Brd4 PID	98

Abbildung 4.23:	Western Blot Analyse zur Bestimmung der Substratspezifität von P-TEFb mit und ohne Brd4 PID	99
Abbildung 4.24:	Domänenarchitektur von Brd4	100
Abbildung 4.25:	Vergleich der P-TEFb und Brd4 Aktivität als CTD Kinasen	100
Abbildung 4.26:	Domänenarchitektur von humanem AFF4	102
Abbildung 4.27:	ESI-MS nach Reinigung der AFF4 Konstrukte	102
Abbildung 4.28:	Bestimmung der Sekundärstruktur von AFF4-A	103
Abbildung 4.29:	Bindungsstudien zur Interaktion der humanen Proteinen AFF4 und CycT1	104
Abbildung 4.30:	Einfluss der verschiedenen AFF4 Konstrukte auf die Aktivität von P-TEFb	106
Abbildung 4.31:	Konzentrationsreihen von AFF4 und ATP zur Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetik der P-TEFb Aktivität	107
Abbildung 4.32:	Bindungsexperiment von AFF4 und Hexim1 an CycT1	108
Abbildung 4.33:	Cyc Alignments	110
Abbildung 4.34:	Cdk Alignments	111
Abbildung 4.35:	SDS-PAGE Analysen, ESI-MS Analysen und Western Blots zur Bestimmung der Reinheit und Aktivität von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK	113
Abbildung 4.36:	Kristallstruktur des Cdk13/CycK-Komplexes	115
Abbildung 4.37:	Überlagerung der Cdk13/CycK und Cdk2/CycA Strukturen	116
Abbildung 4.38:	Sequenzalignment ausgewählter Cdk/Cyclin Paare	117
Abbildung 4.39:	Detailansicht des pT871 im Aktivierungssegment von Cdk13	118
Abbildung 4.40:	C-terminaler Fortsatz von Cdk13	119
Abbildung 4.41:	Bestimmung des IC ₅₀ Wertes von Flavopiridol für Cdk7/CycK und Cdk13/CycK	121
Abbildung 4.42:	Strukturen der Inhibitoren Flavopiridol, Lenalidomid, Thalidomid und Dinaciclib	122
Abbildung 4.43:	Inhibition der Transkriptionselongationskinasen mit verschiedenen Wirkstoffen	123
Abbildung 4.44:	Inhibition von Transkriptionselongationskinasen mittels Dinaciclib	124
Abbildung 4.45:	Bestimmung des IC ₅₀ von Dinaciclib und Flavopiridol für die Transkriptionselongationskinasen	125
Abbildung 4.46:	Sequenzüberlagerung von Cdk2 und Dinaciclib mit Cdk13	126
Abbildung 4.47:	Bestimmung des Einflusses von Pin1 auf die c-Abl vermittelte CTD und c-Myc Phosphorylierung	128
Abbildung 4.48:	Schematische Darstellung der Domänenarchitektur des Protoonkogens c-Myc und deren Mutanten	129
Abbildung 4.49:	Vergleich der Aktivität verschiedener Kinasen auf c-Myc	130
Abbildung 4.50:	Phosphorylierung von GST-CTD _{[9]KKK} , c-Myc und der c-Myc Konstrukte	131
Abbildung 4.51:	Zeitabhängige Kinasereaktion von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK auf c-Myc im Vergleich zur CTD	133
Abbildung 5.1:	Gegenüberstellung der Phosphorylierungssequenzen von c-Myc, der CTD, Spt5 und den SR Proteinen	148
Abbildung 5.2:	Überblick über die Phosphorylierungen und die daran beteiligten Kinasen im Transkriptionszyklus	151
Abbildung 5.3:	Vergleich der elektrostatischen Oberflächen zwischen Transkriptionskinasen und einer Zellzykluskinase	153
Abbildung 5.4:	Darstellung von Flavopiridol und Dinaciclib im aktiven Zentrum von Cdk9, Cdk12 und Cdk13	157

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Überblick über die CTD Phosphorylierungskinasen und ihre Modifikationsreste	13
Tabelle 3.1:	Verwendete Nukleotide und Hersteller	34
Tabelle 3.2:	Verwendete Kits und Hersteller	34
Tabelle 3.3:	Verwendete Größenstandards und Hersteller	35
Tabelle 3.4:	Sonstige verwendete Materialien und Hersteller	35
Tabelle 3.5-6:	Verwendete Mikroorganismen und Zellstämme	36
Tabelle 3.7:	Verwendete DNA-Konstrukte und Hersteller	36
Tabelle 3.8:	Verwendete Enzyme und Hersteller	37
Tabelle 3.9:	Verwendete Antikörper und Hersteller	37
Tabelle 3.10:	Synthetische Peptide	38
Tabelle 3.11:	Materialien und Hersteller für eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie	39
Tabelle 3.12:	Chromatographiermaterialien und Hersteller	41
Tabelle 3.13:	Laborgeräte und Zubehör	41
Tabelle 3.14:	Häufig verwendete Pufferzusammensetzungen	43
Tabelle 3.15:	Zusammensetzung der PCR Ansätze	45
Tabelle 3.16:	PCR Zyklus Parameter	46
Tabelle 3.17:	Zusammensetzung von SDS-PAGE Gelen für insgesamt 4 Gele	56
Tabelle 4.1:	Übersicht über die eingeführten Mutationen	95
Tabelle 4.2:	IC ₅₀ Werte von Cdk9/CycT1, Cdk12/CycK und Cdk13/CycK auf pS7-CTD _[3] mit dem Inhibitor Dinaciclib	125

Formelverzeichnis

Formel 3.1:	Berechnung des Extinktionskoeffizienten	55
Formel 3.2:	Konzentrationsbestimmung nach Lambert-Beer	55
Formel 3.3:	Gibb-Helmholtz-Gleichung	61
Formel 3.4:	Absorptionsunterschied von links und rechts polarisiertem Licht	62
Formel 3.5:	Lambert-Beer'sche Gesetz	62
Formel 3.6:	Elliptizitätsberechnung	63
Formel 3.7:	Berechnung der Elliptizität pro Aminosäurerest	63

1 Zusammenfassung

Die RNA Polymerase II (RNAP II) vermittelt in Eukaryoten die Transkription von allen Protein-kodierenden Genen sowie einigen regulatorischen RNAs. Die Aktivität der RNAP II ist dabei streng kontrolliert. Zur Regulation der Aktivität wird die C-terminale Domäne (CTD) der RNAP II von verschiedenen Kinasen phosphoryliert. Das hochvariable Muster an Phosphorylierungen der repetitiven Heptadstruktur der CTD steht in direkter Verbindung mit den einzelnen Phasen der Transkription. Die Serin-Phosphorylierungen werden durch die Familien der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) vermittelt. Ein elementarer Kontrollpunkt in der Transkription der RNAP II besteht in dem promotorproximalen Pausieren, das den Übergang von der Initiations- in die Elongationsphase markiert. Dabei reguliert unter anderem der positive Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb, der aus den beiden Untereinheiten Cdk9 und Cyclin T1 (CycT1) besteht, die RNAP II. Cdk12 und Cdk13 in Verbindung mit Cyclin K nehmen ebenfalls Einfluss auf den Ablauf der verschiedenen Transkriptionsphasen. Auch die Kinasen Erk1 und Erk2 sind als transkriptionsregulierende Kinasen identifiziert worden. Die zahlreichen Kombinationen der unterschiedlichen Phosphorylierungen der CTD generieren dabei ein spezifisches Markierungsmuster an verschiedenen Stellen auf der CTD, das auch als 'CTD-Code' bezeichnet wird und der Rekrutierung von RNA-regulierenden Faktoren dient.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kinasen Erk1 und Erk2 nach rekombinanter Coexpression in *Escherichia coli* mit der MAP/Erk Kinase (MEK) unter Anwendung von biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht. Funktionale Kinaseassays ergaben eine 2-fach höhere Aktivität von Erk1 auf einem an Position 2 vorphosphorylierten CTD Substrat gegenüber einer unphosphorylierten consensus Sequenz. Bei diesem konsekutiven Mechanismus verläuft die Phosphorylierungsreaktion hin zum N-terminalen Ende der CTD. Zudem konnte in Western Blots gezeigt werden, dass die Kinasen eine Spezifität für die Serin 5 Position der CTD besitzen. Für die Identifizierung einer Serin 2 Kinase wurden verschiedene Cdks und Spleißkinasen getestet. Die biochemischen Analysen von CdkF, das aus rekombinanter Coexpression mit der Kinase Cak1 in Insektenzellen gewonnen wurde, zeigten eine Aktivität von CdkF ohne die regulatorische Untereinheit CycH. Analysen zur Substratspezifität wiesen eine geringe Aktivität der Kinase auf, jedoch konnte durch Western Blot-Analysen eine spezifische Phosphorylierung der CTD an Position 7 gezeigt werden. Die Spleißkinasen Dsk1 und SRPK2 zeigten ebenfalls schwache Phosphorylierungsaktivität auf der CTD. Eine Präferenz dieser Kinasen für spezifische Phosphorylierungsmuster auf der CTD konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Die best-beschriebene Kinase im Transkriptionszyklus der CTD ist der P-TEFb Komplex, der in Zusammenhang mit seinen Regulationsfaktoren Brd4, AFF4 und HIV-1 Tat in dieser Arbeit untersucht wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass allein die C-terminale Domäne von Brd4 eine Aktivierung und Stimulierung von P-TEFb aus dem durch Hexim1

inhibierten Zustand vermittelt. Die Substratspezifität von P-TEFb blieb hingegen bei der Brd4 Aktivierung unverändert. Die für die Aktivität von Brd4 benötigten Sequenzmotive zeigten Ähnlichkeiten mit dem transaktivierenden Tat Protein. Ihnen kommt sowohl in Brd4 als auch in Tat eine entscheidende Rolle zu, wie in Mutationsexperimenten gezeigt werden konnte. Im Unterschied zu Tat erfolgt der Aktivierungsmechanismus von Brd4 jedoch über die Cdk9 Untereinheit. Darüber hinaus konnte der N-terminale Teil des Cofaktors AFF4 als Interaktionspartner von CycT1 mit einer Dissoziationskonstante von 60 nM beschrieben werden. Anhand biochemischer Analysen konnte eine Aufhebung der Hexim1 vermittelten Inhibition von P-TEFb durch AFF4 erreicht werden. AFF4 führt dabei zu keiner Änderung der Substratspezifität von P-TEFb.

Die Tumorprogression ist häufig mit genetischen oder epigenetischen Veränderungen in Cdk's verbunden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verschiedene Kinaseinhibitoren auf ihre Funktion in transkriptionsregulierende Kinasen hin validiert. Flavopiridol zeigte eine Inhibition der Kinase Cdk7, die unter anderem den T-Loop zur Aktivierung von P-TEFb phosphoryliert. Daher ist Flavopiridol kein exklusiver Inhibitor für P-TEFb. In Zusammenarbeit mit Dr. Geoffrey Shapiro, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, konnte eine signifikante Wirksamkeit des Inhibitors Dinaciclib für Transkriptionskinasen gezeigt werden, der IC₅₀ Werte von 62 nM für Cdk12 und 87 nM für Cdk13 aufweist. Detaillierte Einblicke in den Bindevorgang der Wirkstoffe Flavopiridol und Dinaciclib konnten außerdem durch das Modellieren in die Kristallstruktur von Cdk13/CycK gewonnen werden. Die Beteiligung des C-terminalen Fortsatzes von Cdk12 und Cdk13 stellt dabei die Grundlage für die mögliche Entwicklung von spezifischen Inhibitoren dar. Diese Einblicke weisen Optimierungsmöglichkeiten für weitere Derivate der Kinaseinhibitoren auf.

Bisher gilt die CTD als wichtigstes Substrat vieler transkriptionsregulierender Kinasen. In dieser Arbeit konnte die Substratspezifität verschiedener Kinasen auf das Proto-Onkogen c-Myc entschlüsselt werden. Unter den phosphorylierten Aminosäuren wurden in Zeitverlaufexperimenten mittels Mutationsstudien Ser62 und Ser71 als bevorzugte Zielpositionen in c-Myc identifiziert. Die besondere Relevanz der Transkriptionskinasen in der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten macht sie zusammen mit c-Myc, das als Schlüsselregulator der Zellproliferation an der Entstehung von verschiedenen Krebsarten häufig beteiligt ist, zu attraktiven Zielmolekülen bei der Entwicklung von neuen Therapeutika. Die Bestimmung der unterschiedlichen Substratspezifitäten und Enzymaktivitäten von Kinasen ist essentiell, um ihre Beteiligung für die Variabilität der CTD Phosphorylierungen und die damit verbundenen Krankheiten nachzuvollziehen. Die Identifizierung der sie regulierenden Faktoren stellt damit einen weiteren Schritt dar, um die Funktionsweise und Regulation der Transkriptionselongation zu verstehen.

2 Einleitung

Alle Lebewesen zeichnen sich trotz ihrer phänotypischen Mannigfaltigkeit durch eine sehr ähnliche Grundeinheit aus, die Zelle. Diesen Zellen lassen sich zwei Arten zuordnen, die prokaryotischen Zellen, denen ein abgrenzender Zellkern fehlt und in Bakterien und Archaeen unterteilt werden, sowie die eukaryotischen Zellen, die diesen namensgebenden Zellkern besitzen. Im Zellkern einer eukaryotischen Zelle liegt das Genom in Form von mehreren Chromosomen vor. Diese linearen DNA-Moleküle enthalten in den Genen die Informationen für alle Proteine und RNAs, die von dem jeweiligen Organismus gebildet werden können. Von dieser genomischen Information exprimiert jede Zelle jedoch nur einen spezifischen Satz von Genen und kann dadurch ihren charakteristischen Phänotyp ausbilden. Daher ist es für alle zellulären Organismen essenziell, die Expression ihrer Gene genau zu regulieren, um das eigenes Wachstum, ihre Entwicklung und Vermehrung, in höheren Organismen sogar den Tod zu kontrollieren und gegeben falls sich auch verändernden Umweltbedingungen anzupassen. Diese Vorgänge können unter anderem durch äußere Einflüsse und Viren gestört werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an eukaryotischen Kinasen und Proteinen gearbeitet, die in verschiedenen Krankheiten involviert sind.

2.1 HIV und Krebs

Das HI-Virus ist ein Retrovirus, das zu der Gruppe der Lentiviren gehört. Es besitzt ein Genom von nur neun Genen, die unter anderem für das Protein Tat (Transaktivator der Transkription, Abschnitt 2.5.3) kodieren, das die Genexpression des Virus stimuliert. Es bringt menschliche im Blut lokalisierte T-Immunzellen dazu, sein Viruserbgut rund 100mal häufiger zu vermehren als ihr eigenes. Viele HIV-positive Menschen sind daher auch mit anderen opportunistischen Erregern infiziert, die das Immunschwäche-Syndrom hervorrufen. Derzeit leben 34 Mio. Menschen weltweit mit dem HI-Virus. Als HIV-positiv bezeichnet man einen Menschen, der das HI-Virus in sich trägt. Ende 2013 waren 78.000 Menschen in Deutschland mit dem HI-Virus infiziert, darunter 63.000 Männer und 15.000 Frauen. Es wird geschätzt, dass rund 30 Prozent aller Menschen mit HIV in Deutschland noch nicht diagnostiziert wurden. Die häufigsten Infektionsquellen sind Geschlechtsverkehr, darunter Analverkehr bei Männern, sowie Bluttransfusionen und Drogeninjektionen.

Im Jahr 1981 wurde bei 26 bis dahin gesunden jungen homosexuellen Männer das Kaposi-Sarkom beobachtet (Friedman-Kien, 1981). Dabei waren die Lymphknoten, die inneren Organe und die Schleimhäute ebenso von Tumoren betroffen wie die Haut. Gleichzeitig lagen andere lebensbedrohliche Infektionen in Verbindung mit einer ausgeprägten Schwächung des Immunsystems vor. Kurze Zeit später wurde dieses Krankheitsbild als erworbenes Immunschwächesyndrom (AIDS) beschrieben. Erst einige Zeit später wurde

nachgewiesen, dass die HIV Infektion die Ursache für das Immunschwächesyndrom war. Von AIDS spricht man deshalb erst dann, wenn das Immunsystem soweit geschwächt ist, dass viele Krankheitserreger, die normalerweise vom Immunsystem in Schach gehalten werden können, sich ausbreiten und diese sogenannten opportunistischen Infektionen hervorrufen. Aufgrund der durch Retroviren verursachten Immunschwäche entwickeln sich häufig Tumore, die zu Krebs führen.

Krebs ist eine Krankheit, die sich durch anormale und unkontrollierte Zellteilung entsteht und zu invasivem Wachstum oder Tumoren führt, welche sich im gesamten Körper ausbreiten können. Die Krebsart Leukämie wird als Krankheit der weißen Blutzellen bezeichnet.

Wie alle Lebewesen ist auch der Mensch das Produkt komplex miteinander wechselwirkender Zellen. Jede der 10 Billionen Zellen unseres Körpers trägt die gleichen genetischen Erbinformationen, von denen aber je nach Differenzierung der Zelle im Körper nur ein bestimmter Teil jeweils genutzt wird. Eine Veränderung dieser Erbinformationen im lebenden Organismus kann zu Krebs führen. Krebs ist eine vielschichtige Krankheit, die unter anderem durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden kann. Man versteht darunter jede Veränderung eines Gewebes, bei der die Zellen ihre Differenzierungsfähigkeit verlieren und daher autonom, also selbstständig wachsen können. Während der Mensch und somit auch die Körperzellen einer bestimmten Lebensdauer unterliegen, sind bei Tumorzellen die Mechanismen, die der Kontrolle von Wachstums- und Teilungsprozessen dienen, häufig defekt, so dass diese zu einem uneingeschränkten Wachstum fähig sind. Während Krebs bösartige oder gutartige Neubildungen umfasst, die ein Organ betreffen, bezeichnet Leukämie eine Erkrankung des blutbildenden Systems, die sich auf den gesamten Organismus auswirkt.

Die Leukämie, mitunter auch Blutkrebs genannt, ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems und des Knochenmarks, die erstmals 1845 von Rudolf Virchow beschrieben wurde. In Deutschland erkranken nach Angaben des Robert-Koch-Instituts jährlich etwa 11.560 Menschen an Leukämie, bei Kindern handelt es sich mit 34,1 % der Diagnosen um die häufigste Krebserkrankung. Allgemein handelt es sich bei Leukämien um Erkrankungen, welche durch die Ansammlung maligner Leukozyten, weißer Blutzellen, primär im Knochenmark und später im Blut gekennzeichnet sind. Diese abnormen Blutzellen besitzen keine normale Differenzierungsfähigkeit. Die Leukämiezellen breiten sich im Knochenmark aus, verdrängen dort die übliche Blutbildung und treten in der Regel auch stark vermehrt im peripheren Blut auf. Ein weit verbreitetes Merkmal von Leukämien sind genetische Veränderungen, wobei die Entstehung der Leukämie häufig mit reziproken chromosomalen Translokationen assoziiert ist, welche zur Bildung chimärer Genprodukte führen. Eine Vielzahl dieser reziproken Translokationen basieren auf Translokationen des MLL Gens (Mixed Lineage Leukämie), die mit dem Krankheitstyp einer AML (akute myeloische Leukämie) oder einer ALL (akute lymphatische Leukämie) verbunden ist (Abschnitt 2.5.4). Die Zellen eines Tumors, die alle von einer gemeinsamen Ursprungszelle

abstammen, sind durch Mutationen, d. h. einer Veränderung der Basenabfolge in der DNA, entstanden.

2.2 Die Organisation der DNA in Zellen

Die kleinste lebensfähige selbst reproduzierende Einheit des Lebens ist die Zelle. Jede menschliche somatische Körperzelle (d.h. alle Zellen außer Spermien und Eizellen) enthält 46 Chromosomen. Diese Chromosomen sind aus über 6,4 Milliarden Basenpaaren aufgebaut, die für bis zu 100.000 Gene kodieren können (Lee and Young, 2013). Jede Zelle speichert ihre Erbinformation als doppelsträngige DNA (engl.: *desoxyribonucleic acid*), also zwei um sich gewundene, gegenläufige Nukleotidstränge (Watson and Crick, 1953). Diese kovalent verknüpften Nukleotide bestehen aus dem Zucker Desoxyribose mit einer angehängten Phosphatgruppe, was dem Rückgrat entspricht, und einer der vier stickstoffhaltigen Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Die Abfolge der Basen bestimmt die spezifische Information des Erbguts. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken werden die komplementären Stränge der Doppelhelix zusammengehalten. Dies ermöglicht eine energetische höchst günstige Packung der Basenpaare im Inneren der Helix. Bei höher entwickelten Organismen, den Eukaryoten, ist es nötig, die etwa 2 m lange DNA einer Zelle in Chromosomen zu verpacken (Abbildung 2.1). Nukleosomen sind dabei die Grundeinheit der Chromosomenstruktur, bei der die DNA um das 10.000-fache verdichtet werden kann. Der scheibenförmige Kern eines Nukleosoms besteht aus den Histonen H2A und H2B, die zwei Dimere ausbilden, und einem Tetramer aus je zwei H3 und H4 Histonen (Abbildung 2.1; Luger et al., 1997). Die DNA ist als linksgängige Schraube in 1,7 Windungen eng um diesen oktameren Komplex gewunden und über zahlreiche Wasserstoffbrücken mit ihm verbunden. Trotz dieser hoch kondensierten Struktur muss die DNA unter anderem für die Genexpression zugänglich bleiben. Durch einen ATP abhängigen Dekondensierungsprozess kann die Chromatinstrukturen der DNA gelockert und zugänglich gemacht werden, um die auf der DNA kodierte Gene zu exprimieren.

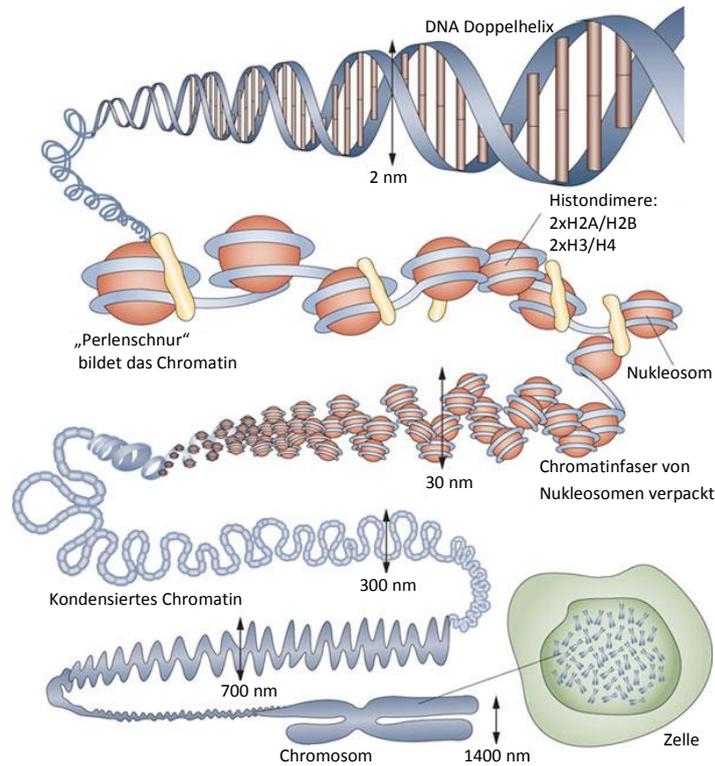


Abbildung 2.1: Darstellung von der Zelle zur DNA

Als Chromatin wird DNA bezeichnet, die in Histonen und Kernproteinen komplexiert und zu einem Chromosom kondensiert ist. Das kondensierte Chromatin besteht aus Nucleosomen, die verwendet werden, um das Genom in den Zellkern zu verpacken. Der Kern der Nucleosomen besteht aus einem Oktamer, das aus zwei Kopien der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist. Um diesen Kern windet sich die DNA (Tonna et al., 2010).

Bei der Genexpression wird die genetische Information abgelesen und in einem Zweistufen-Vorgang genutzt, der Transkription und der Translation. Nur ein kleiner Anteil der gesamten zellulären DNA kodiert Gene, der größte Anteil der DNA besteht aus nicht-kodierender DNA. Der Weg von der DNA bis hin zum fertigen Protein ist auch als zentrales Dogma der Molekularbiologie bekannt und beginnt mit dem Umschreiben der DNA in RNA, das Transkription genannt wird, gefolgt von einem Prozessierungsschritt und der anschließenden Translation in Proteine (Abbildung 2.2).

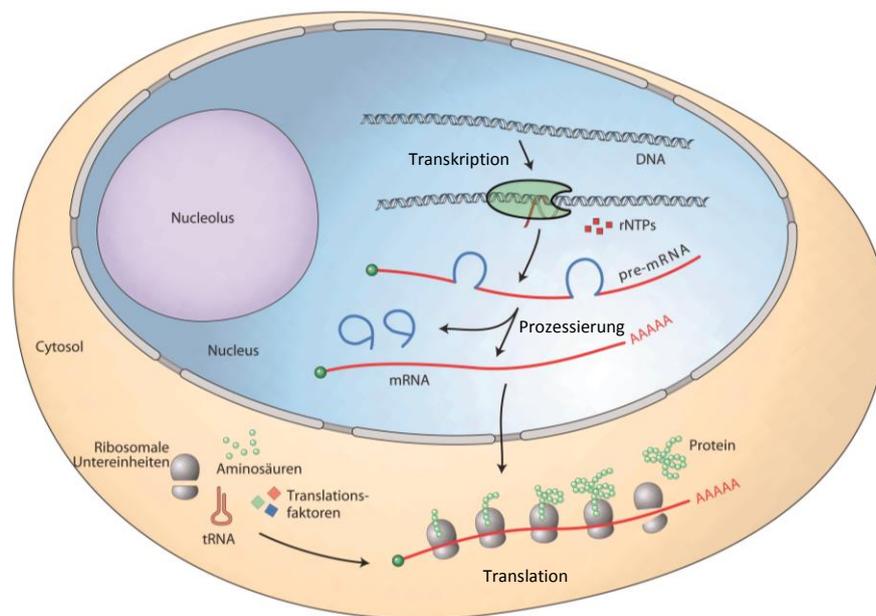


Abbildung 2.2: Überblick über den Informationsfluss von DNA über RNA zum Protein in Eukaryoten

Während der nukleären Transkription in eukaryotischen Zellen werden genetische Information der DNA von RNA-Polymerasen in mRNA umgeschrieben. Die RNA-Transkripte reifen in einer Serie von Prozessierungsschritten wie 5'-Ende-Capping, Spleißen und Polyadenylierung, um im Anschluss aus dem Zellkern exportiert zu werden. Im Cytoplasma dient die mRNA als unmittelbare Vorlage für die Translation in das kodierende Proteinprodukt (Lodish et al., 2003).

2.3 Die Transkription in Eukaryoten

Bei der Transkription werden Abschnitte der DNA verwendet, um die Synthese von RNA-Molekülen zu lenken. Die RNA besteht wie die DNA aus vier verschiedenen Nukleotidbausteinen, die über Phosphodiesterbindungen verbunden sind. Chemisch unterscheiden sich die beiden Polymere durch ihr Zuckerrückgrat und einer Base. Anstatt Desoxyribose enthält die RNA die Zuckereinheit Ribose und anstatt der Base Thymin enthält die RNA Uracil, wobei die komplementäre Basenpaarung gleich bleibt.

Nach dem Öffnen der DNA-Doppelhelix für die Transkription, bei dem die Einzelstränge freigelegt werden und ein Strang als Matrize für die Synthese der RNA dient, wird ein Ribonukleotid an die wachsende RNA-Kette über eine enzymatische katalysierte Reaktion kovalent geknüpft. Dieser wichtige Prozess wird von zahlreichen Proteinen und Faktoren reguliert, um die Produktion von Proteinen und der RNA zu kontrollieren und die damit verbundene Funktionalität der Zelle zu gewährleisten (Saunders et al., 2006). Die Transkription wird in Eukaryoten von drei verschiedenen RNA-Polymerasen (RNAP) durchgeführt, wobei jede Polymerase unterschiedliche RNAs synthetisiert. RNAP I transkribiert ribosomale RNA (rRNA), RNAP II alle proteinkodierenden Gene also messenger RNA (mRNA), sowie kleine nukleäre RNA (snRNA), und RNAP III produziert

transfer RNA (tRNA) und andere kleinere RNAs (Cramer et al., 2008). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der RNAP II abhängigen Transkription und deren Prozesse, da sie die proteinkodierenden Gene transkribiert. Dabei unterliegt die Transkription einem wiederkehrenden Ablaufschema, der auch als Transkriptionszyklus bezeichnet wird.

2.3.1 Der Transkriptionszyklus

Bei dem Transkriptionszyklus handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der in drei Phasen eingeteilt wird: Initiation, Elongation und Termination (Abbildung 2.3). Im ersten Schritt muss die Verpackung der DNA in Nukleosomen und in hochgradig geordnete Chromatinstrukturen entwunden werden. Diese Aufgabe wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, den sogenannten TFII, übernommen. Der generelle Transkriptionsfaktor TFIID erkennt und bindet mittels seiner Untereinheit TBF die TATA-Box, die 25 Nukleotide entfernt aufwärts von der Transkriptionsstartstelle liegt und den Startpunkt signalisiert (Bushnell et al., 2004). Bei dieser Bindung verformt sich die TATA-Box der DNA, was die Bindung von TFIIB ermöglicht. TFIIB erkennt das BRE-Element (engl.: *B recognition element*) und positioniert die RNAP II exakt am Transkriptionsstartpunkt (Orphanides et al., 1996; Roeder, 1996). TFIIF stabilisiert dabei die Wechselwirkung der RNAP II mit TFIIB und sorgt für die Bindung von TFIIE. Dieser Faktor zieht wiederum TFIIH an und reguliert ihn. TFIIH, bestehend aus neun Untereinheiten und unter anderem einer Helicase Untereinheit, entwindet nun die DNA am Startpunkt (Kim et al., 2000; Wang et al., 1992). Des Weiteren wird ein Proteinkomplex namens Mediator Komplex benötigt, der die Kommunikation zwischen den benötigten Aktivatorproteinen, der RNAP II und den TFII herstellt (Asturias et al., 1999; Kornberg, 2005; Sikorski and Buratowski, 2009). Dieser ganze Komplex aus den generellen Transkriptionsfaktoren (GTF, engl.: *general transcription factor*) und der Polymerase II ist auch als Prä-Initiation Komplex (PIC) bekannt (Cramer, 2004; Grunberg et al., 2012).

Neben der proximalen TATA-Box spielt auch eine entfernt liegende distale Enhancer-Sequenz bei der Rekrutierung des PICs an die zu transkribierende DNA eine wichtige Rolle. Enhancer sind Elemente, die die Transkription aufwärts oder abwärts von den Zielgenen induzieren (Müller et al., 1988). Die RNAP II verharrt nun zunächst am Promotor und synthetisiert kurze RNA-Ketten, bis sie sich durch eine Reihe von Konformationsänderung vom Promotor wegbewegen kann, um in die frühe Elongationsphase überzugehen. Dabei phosphoryliert die Kinaseuntereinheit des TFIIH die C-terminale Domäne der RNAP II, destabilisiert die Bindung zu den GTFs und setzt sie vom Promotor frei (Kim et al., 1997; Sainsbury et al., 2013). Diese Phosphorylierung stellt einen wesentlichen Schritt bei der Transkription dar. Nach der Synthese einer ca. 25- 30 Nukleotid langen RNA arrestiert die RNAP II. Bei diesem sogenannten promotorproximalen Pausieren inhibieren die negativen Transkriptionselongationsfaktoren NELF (engl.: *negative elongation factor*) und DSIF (engl.: *DRB-sensitivity inducing factor*) die RNAP II (Chiba et al., 2010; Renner et al., 2001; Wada et al., 1998; Yamaguchi et al.,

1999). Die durch den frühen Elongationskomplex gebildete 25 Nukleotid lange RNA wird nun durch Anfügen eines Caps am 5'-Ende modifiziert, das aus einem veränderten Guaninnukleotid (7-methyl-GppA-Kappe) besteht. Diese Capping-Reaktion wird durch verschiedene Enzyme bewerkstelligt, die an die phosphorylierte C-terminale Domäne der RNAP II gebunden sind (Rasmussen and Lis, 1993; Schroeder et al., 2000). Die 5'-Kappe dient zur Erkennung des 5'-Endes einer mRNA, weiteren RNA-Prozessierungsschritten und zum Schutz der pre-mRNA vor Abbau. Um nun in die produktive Elongation überzugehen, braucht es eine Reihe von positiven Transkriptionselongationsfaktoren. Eine zentrale Rolle spielt dabei P-TEFb, eine Kinase aus den beiden Untereinheiten Cdk9 (engl.: *Cyclin dependent kinase*) und CycT1 (Cyclin T1). P-TEFb ist dabei für eine weitere Phosphorylierung der C-terminalen Domäne von RNAP II und eine Phosphorylierung der beiden negativen Faktoren DSIF und NELF verantwortlich (Fujinaga et al., 2004; Yamada et al., 2006). Dabei wird die Spt5 Untereinheit von DSIF, die RD Untereinheit in NELF und die C-terminale Domäne der Rpb1 Untereinheit phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne von RNAP II können Prozessierungsfaktoren für das Spleißen und für die Polyadenylierung der prä-mRNA und andere Proteine, die eine Funktion bei der Transkriptionselongation haben, binden (Buratowski, 2009; McCracken et al., 1997). Die Phosphorylierung von NELF bewirkt die Dissoziation vom arretierten Promotor-proximalen Arrestkomplex und DSIF wird in einen positiven Elongationsfaktor transformiert (Hartzog et al., 1998; Kim and Sharp, 2001; Nechaev and Adelman, 2011; Peterlin and Price, 2006; Sims et al., 2004). Nun kann die vollständige mRNA synthetisiert werden bis es zur Termination der Transkription kommt. Dabei befindet sich ein AAUAAA Motiv auf der RNA, das für die Polyadenylierung benötigt wird und so den Endpunkt der Transkription darstellt (Coin and Egly, 1998). Das poly-A Signal wird erkannt, die RNA 10-30 Nukleotide hinter dem Signal von der RNAP II getrennt und der poly-A Schwanz zum Schutz vor Abbau und zur Erkennung angefügt (Bentley, 2005). Nach der Termination wird die DNA von der RNAP II freigelassen und kann recycelt werden, um einen neuen Transkriptionszyklus zu beginnen (Svejstrup et al., 1997).

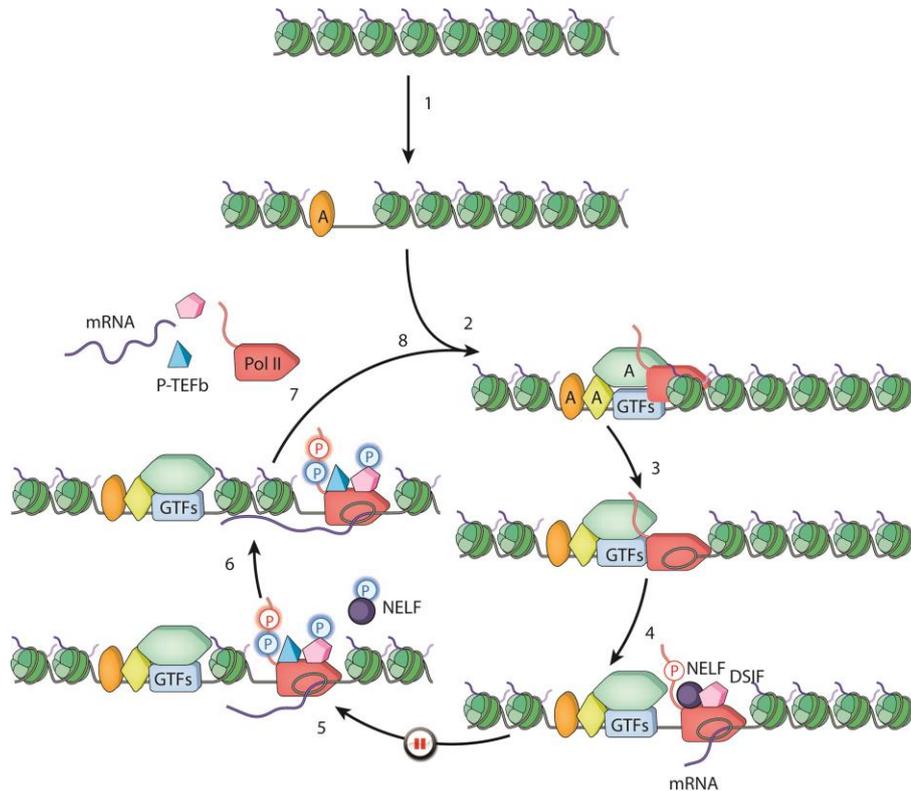


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II

1) Chromatinöffnung (grün), 2) Formierung des Prä-Initiationskomplexes über Aktivatorproteine (McMillin et al., 2011), genereller Transkriptionsfaktoren (GTFs) und der RNAP II (rot), 3) Initiation der Transkription, Synthese eines 25 Nukleotid langen mRNA Fragments, 4) Promotor-proximales Pausieren durch negative Transkriptionselongationsfaktoren (NELF, DSIF), 5) Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNAP II, NELF und DSIF, dadurch Freisetzung der RNAP II, 6) produktive Elongation, 7) Termination der Transkription, 8) Recycling der RNAP II (Fuda et al., 2009).

2.3.2 Die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II

Die RNA Polymerasen entwickelten sich sehr früh in der Evolution. Sowohl in Bakterien als auch in Säugetieren sind diese Enzyme hoch konserviert (Burton, 2014). Die RNAP II übernimmt dabei die wohl wichtigste Aufgabe, sie transkribiert kodierende Gene. Die größte Untereinheit der RNAP II ist die Rpb1, welche eine sich wiederholende konservierte Heptasequenz am C-terminalen Ende aufweist. Sie befindet sich unmittelbar unterhalb des RNA-Austritt-Kanals der Polymerase (Cramer et al., 2001). Ein einzelner consensus Repeat besteht aus den sieben Aminosäuren $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$, wobei die Anzahl der Wiederholungen von Organismus zu Organismus variiert (Abbildung 2.4). So liegen beispielsweise bei Säugetieren 52 Wiederholungen dieser Heptasequenz vor und in Hefen 26 Wiederholungen (Egloff and Murphy, 2008). Die CTD spielt eine essentielle Rolle während des kompletten Transkriptionszyklus. Dabei ist sie nicht nur für die Initiation, dem promotorproximalen Pausieren, der Elongationsphase und der Termination verantwortlich, sondern auch für die Wahl der Exonbereiche für das exakte Spleißen, die 3'-Prozessierung der mRNA, der Chromatinmodifikation und den Export der mRNA in das Cytoplasma

(Buratowski, 2009). Die C-terminale Domäne der Rpb1-Untereinheit stellt eine wichtige Plattform zur Regulation der Transkription und der anschließenden mRNA-Prozessierung dar.

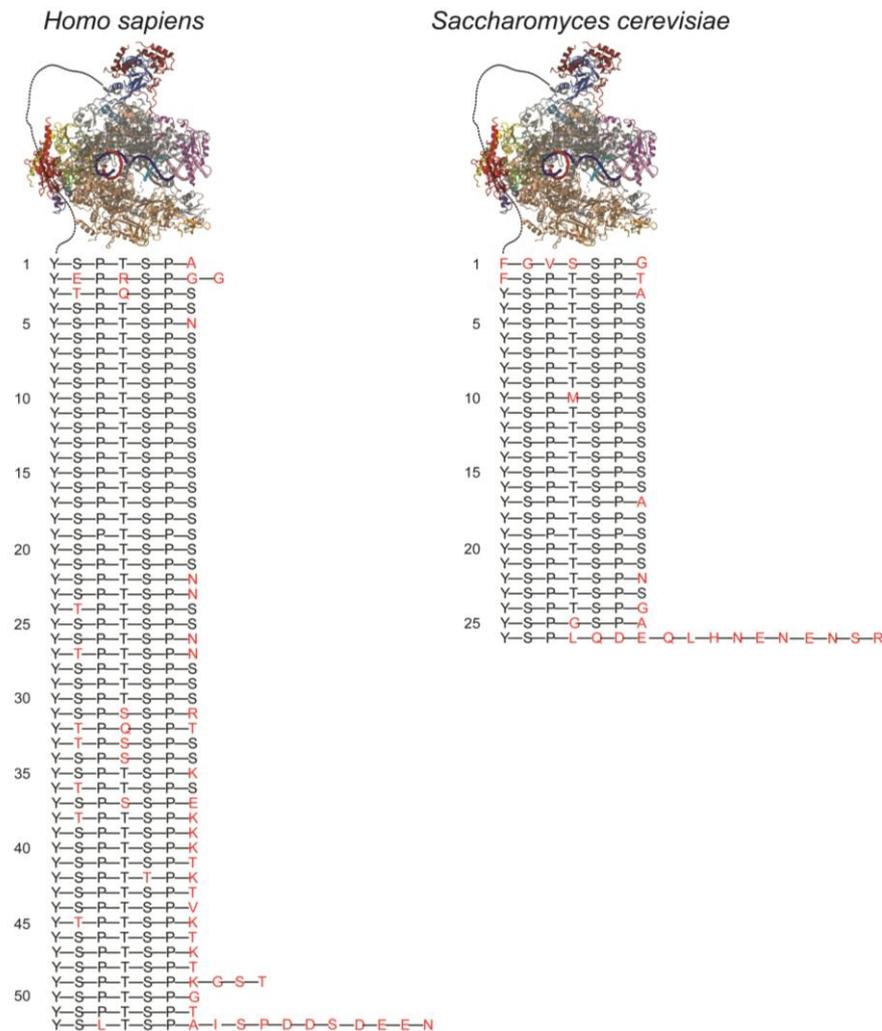


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der C-terminalen Domäne (CTD) von RNAP II
Vergleich der CTD-Sequenzen von *Homo sapiens* und *S. cerevisiae* (Kettenberger et al., 2004).
Abweichungen von der consensus Sequenz sind in rot dargestellt. Die RNAP II ist strukturell oben dargestellt, allerdings bis heute nur für den Hefe Organismus strukturell bekannt.

Die CTD unterliegt einer Reihe von Modifikationen (Abbildung 2.5), deren Auswirkungen aber noch nicht vollständig geklärt sind. Zudem gibt es noch keine umfangreichen Untersuchungen, welche Modifikationen in Kombination miteinander stehen oder welche Modifikationen sich gegenseitig ausschließen. Gefunden wurde die Glykosylierung von Thr4 Ser5 und Ser7 (Kelly et al., 1993; Ranuncolo et al., 2012). Die Hydroxygruppen der Aminosäuren Tyrosin, Threonin und Serin können phosphoryliert bzw. verestert werden. Auch Acetylierungen und Methylierungen wurden als weitere Modifikationen identifiziert (Heidemann et al., 2012; Schröder et al., 2012). Die Lysin-Acetylierung reguliert dabei die Transkription durch die Bindung an Histone und Histonproteine und die Methylierung

nimmt Einfluss auf die Synthese von kleineren RNAs. Die Proline unterliegen zusätzlich einer *cis-trans* Isomerisierung und stabilisieren die Sekundärstruktur der CTD und verhindern damit den proteolytischen Abbau (Jasnovidova and Stefl, 2013; Verdecia et al., 2000). Diese Modifikationen führen zu 432 ($2 \cdot 2 \cdot 2 \cdot 3 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 3$) möglichen Kombinationen in einer einzelnen Heptawiederholung der CTD.

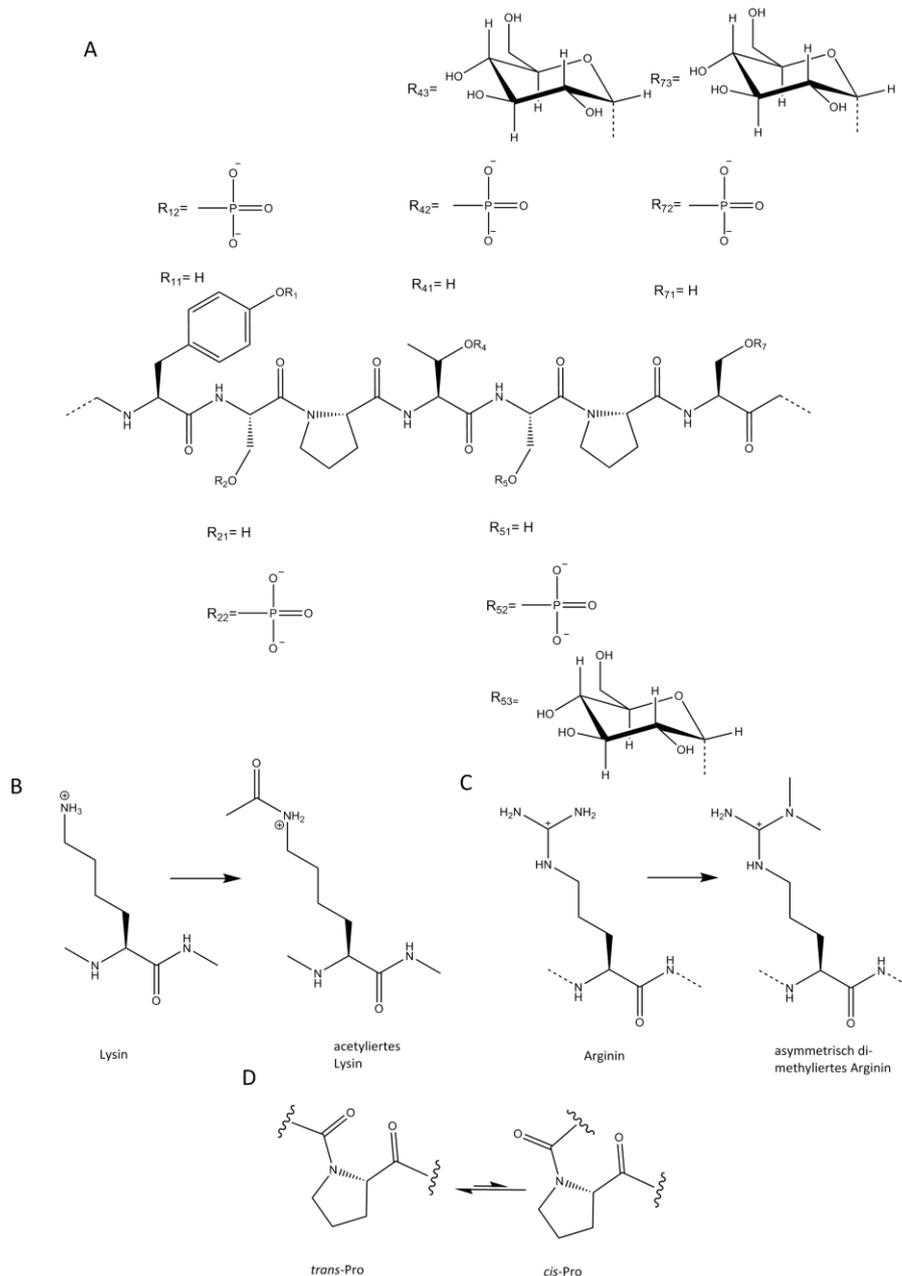


Abbildung 2.5: Posttranslationale Modifikationen der CTD

A: Die fünf Aminosäuren Tyr1, Ser2, Thr4, Ser5, Ser7 können reversibel phosphoryliert werden. Für Ser5 und Ser7 wurde zudem eine O-Glykosylierung beschrieben. **B:** Lysine können acetyliert werden. **C:** Das Arginin an Position 1810 kann asymmetrisch am Guanidiniumion dimethyliert werden. **D:** Pro3 und Pro6 unterliegen einer *cis-trans* Isomerisierung. Weitere bis heute gefundenen Modifizierungen wurden hinzugefügt (Eick and Geyer, 2013).

Die verschiedenen Modifizierungen der CTD an unterschiedlichen Stellen scheinen einen Code darzustellen, der auch als 'CTD-Code' bezeichnet wird und direkt oder indirekt Einfluss auf die Transkription, die RNA Prozessierung und die Chromatinmodifikation nimmt (Buratowski, 2009; Corden, 2013; Eick and Geyer, 2013; Sims et al., 2004).

Die Phosphorylierung der CTD durch Kinasen ist bislang die am besten charakterisierte Modifikation, allerdings sind weder die Spezifität der Kinasen noch die Funktion der Phosphorylierungen im Detail verstanden (Abbildung 2.6). Durch die hochgradige Phosphorylierung nimmt die CTD eine hyperphosphorylierte I_o-Form ein, die in einem SDS-Gel langsamer läuft als die hypophosphorylierte I_a-Form.

Tabelle 2.1: Überblick über die CTD Phosphorylierungskinasen und ihre Modifikationsreste (Eick and Geyer, 2013).

Organismus	Modifikation der CTD	Kinase
Säugetier	Ser5-P, Ser7-P	Cdk7 (TFIIH)
	Ser5-P	Cdk8 (Mediator)
	Ser2-P, Ser5-P, Ser7-P	Cdk9 (P-TEFb)
	Ser2-P, Ser5-P	Cdk12
	Ser2-P, Ser5-P	Cdk13
	Thr4-P	Plk3
	Tyr1-P	c-Abl1, c-Abl2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ser5-P, Ser7-P	Kin28
	Ser5-P	Cdk8 (Srb10)
	Ser2-P, Ser5-P, Ser7-P	Bur1
	Ser2-P	Ctk1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ser5-P, Ser7-P	Mcs6
	Ser5-P	Cdk8
	Ser2-P, Ser5-P	Cdk9
	Ser2-P	Lsk1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser7-P	CdkF;1

Ein Überblick über die Phosphorylierungskinasen in verschiedenen Organismen ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Bekannt ist, dass die Untereinheit von TFIIH Cdk7 in Hefe, Cdk7/CycH aus Säugetieren, Kin28 aus der Hefe *S. cerevisiae* und Msc6 aus der Hefe *S. pombe* Ser5 phosphorylieren. Während der Bildung des PICs interagiert die unphosphorylierte RNAP II mit dem Mediatorkomplex und den GTFs, dabei wird die CTD an Position Ser5 von der Kinase Kin28/Cdk7 phosphoryliert. Cdk8, eine Untereinheit des Mediatorkomplexes und ebenfalls eine Ser5 Kinase, ist ebenfalls an der Einleitung der Transkriptionselongation beteiligt (Liao et al., 1995; Sun et al., 1998). Cdk7 und Kin28 wurden zudem als Ser7 Kinasen im Menschen und in Hefen gefunden (Akhtar et al., 2009; Egloff et al., 2010; Glover-Cutter et al., 2009; Hong et al., 2009; Kanin et al., 2007; Kim et al., 2009; Viladevall et al., 2009). Die Phosphorylierung an Ser2 und Ser5 bietet eine

Bindungsplattform für das Capping-Enzym, die Spleiß- und Polyadenylierungsmaschinerie und für Faktoren zur Termination der Transkription (Kim et al., 1997; Kim et al., 2004; McCracken et al., 1997). P-TEFb, aus den beiden Untereinheiten Cdk9 und CycT1, ist dabei wohl die promiskuitivste Kinase. Zunächst wurden sie als Ser2 Kinase beschrieben, doch neuere Studien zeigen auch eine Ser5 und Ser7 Aktivität (Czudnochowski et al., 2012). P-TEFb wurde als Homolog von Bur1 aus Hefe beschrieben. Durch Sequenzvergleiche wurden auch Cdk12 und Cdk13 als Orthologe der aus der Hefe stammenden Ctk1 Kinase identifiziert. Cdk12 und Cdk13 wurden vor kurzem als Ser2 (Blazek et al., 2011) und Ser5 Kinasen (Bösken et al., 2014) beschrieben. In Säugetieren wurde die *polo-like kinase* Plk3 gefunden, die Thr4 (Hintermair et al., 2012; Hsin et al., 2011) phosphoryliert. Tyr1 wird von c-Abl1 und c-Abl2 modifiziert (Baskaran et al., 1996; Baskaran et al., 1993; Mayer et al., 2012). Eine Ser7 Phosphorylierung durch die Kinase CdkF;1 wurde zudem in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Tabelle 2.1, Abbildung 2.7; Hajheidari et al., 2012; Hajheidari et al., 2013).

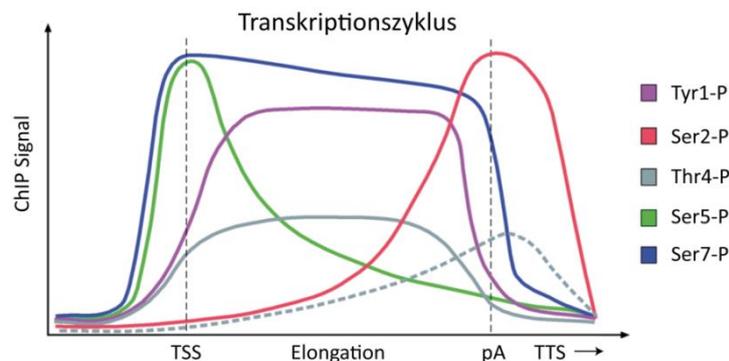


Abbildung 2.6: Phosphorylierungsmuster der RNAP II CTD während des Transkriptionszyklus
 Änderung der CTD Modifizierung entlang der Transkription eines Gens in *S. cerevisiae*. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Säugetierzellen gefunden. Die gestrichelte Linie zeigt die Abweichung bei Thr4-P in Säugetieren. Bei der ChiP Methode werden über spezifische Antikörper Unterformen der RNAP II gemeinsam mit der jeweils gebundenen DNA isoliert und über DNA microarrays oder mittels Sequenzierung der nächsten Generation (engl.: *next generation sequencing*) bestimmten Bereichen innerhalb von Genen zugeordnet (Johnson et al., 2007; Orlando and Paro, 1993). Das ChIP-Signal entspricht der Anreicherung der jeweiligen Unterformen im Verlauf eines Gens (Eick and Geyer, 2013).

Die unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster der CTD während der Transkription konnten mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChiP) detektiert werden (Abbildung 2.6). Dabei entspricht das ChiP Signal der jeweiligen Unterform im Verlauf eines Gens und bestimmt so die verschiedenen Phosphorylierungen während der Transkription. Zu Beginn des Transkriptionszyklus liegt die CTD in unphosphorylierter Form vor. Für die Initiation der Transkription muss die RNAP II CTD an Ser5 phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung nimmt nach dem Transkriptionsstart (TSS, engl.: *transcription start site*), bzw. nach dem promotorproximalen Pausieren zur Polyadenylierung (pA) und zur Transkriptionstermination (TTS, engl.: *transcription termination site*) hin ab. Die Ser7 Phosphorylierung startet ebenfalls schon während der Initiation, wird jedoch bis zur Einleitung der Termination nicht wesentlich geringer. Während der Einleitung der Termination findet die Ser2 Phosphorylierung statt, die bei der Polyadenylierung und dem

Spleißen maximal vorliegt. Eine geringe Ser2 Phosphorylierung ist schon während der Elongation detektierbar, wird aber während der Transkriptionsinitiation nicht benötigt. Sowohl die Tyr1-P als auch die Thr4-P kommen nur während der Elongation vor.

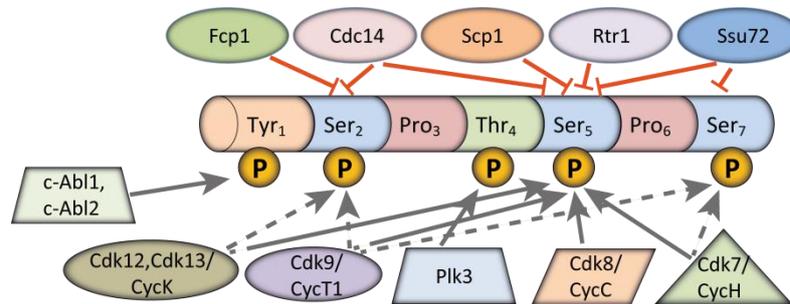


Abbildung 2.7: Consensus Sequenz der CTD mit den relevanten Kinasen und Phosphatasen

Die modifizierten Kinasen sind unterhalb der consensus Sequenz dargestellt, während die Phosphatasen oberhalb abgebildet sind.

Das Muster der Phosphorylierung, ihrer vielseitigen Kombinationen mit anderen möglichen Modifikationen, ist bislang unklar. Das charakteristische Phosphorylierungsprofil der CTD ergibt sich aus dem komplexen Zusammenspiel der Kinasen mit den Phosphatasen, welche im Verlauf der Transkription rekrutiert werden (Abbildung 2.7). Diese vermitteln neben der Dephosphorylierung einzelner Markierungen (Bataille et al., 2012; Egloff et al., 2012) nach Abschluss der Transkription ebenso das Recycling (Cho et al., 1999) der gesamten RNAP II und schließen damit den Kreislauf im Transkriptionszyklus.

2.4 Transkriptionsregulierende Kinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, die zur Klasse der Transferasen gezählt werden und spezifisch die Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten wie Serin, Threonin oder Tyrosin im Zielprotein katalysieren. Als Phosphat-Donor dienen dabei die γ -Phosphatgruppen des Co-Substrates Adenosin-5'-triphosphat (ATP) oder in Einzelfällen auch anderer Nukleotide wie GTP. Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ubiquitär verbreitet und beeinflusst nahezu alle Prozesse im zellulären Leben (Cohen, 2002; Fischer and Krebs, 1955). Sie kann zu Ladungs- und Konformationsänderungen von Proteinen führen und so die Eigenschaften dieser beeinflussen, wie beispielsweise die Aktivität oder Interaktion mit anderen Proteinen. Kinasen werden anhand ihrer Aminosäuresequenz, Spezifität, Wirkungsweise und strukturellen Ähnlichkeiten in verschiedene Untergruppen eingeteilt. In Eukaryoten werden die Proteinkinasen in 9 Untergruppen unterschieden (Abbildung 2.8). Eine der großen Untergruppen ist die CMGC-Gruppe, wozu die MAPK und Cdks gehören (Hunter and Plozman, 1997). Cdks regulieren den Ablauf der verschiedenen Phasen des Zellzyklus in Verbindung mit deren Aktivierung durch die Cyclin Partner. Die Tumorerkrankung ist häufig mit genetischen oder epigenetischen Veränderungen in Cdks oder Cyclinen verbunden (Morgan, 1997). MAP-Kinasen wurden in den späten 1980er Jahren entdeckt und gehören zu den am meist untersuchten Signalübertragungsmolekülen. MAP-Kinasen

spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation vieler zellulärer Prozesse und nehmen bei der Proliferation, der Differenzierung und dem Zelltod in allen eukaryotischen Stämmen und Geweben von Metazoen über die MAP-Kinase-Kaskaden eine entscheidende Rolle ein.

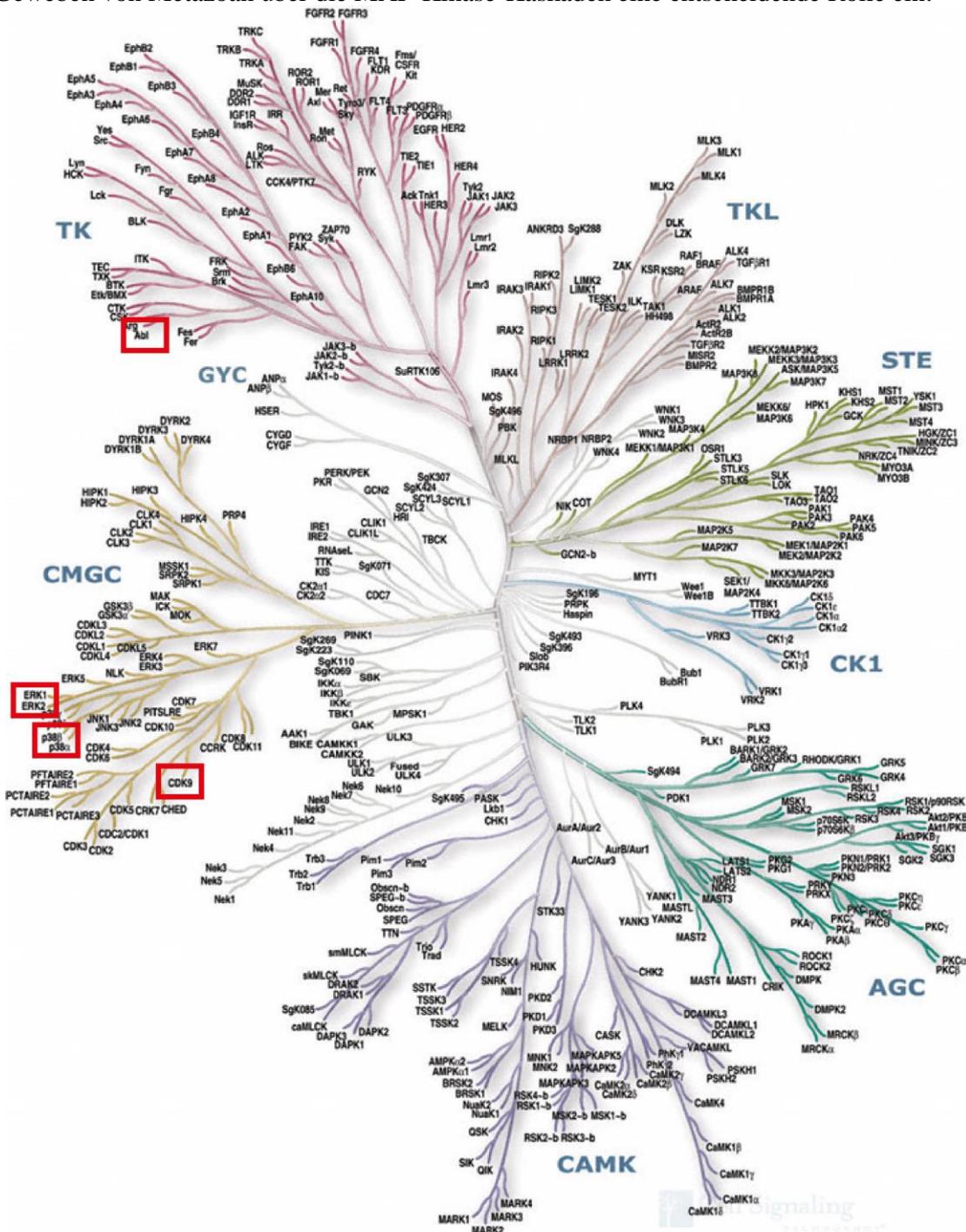


Abbildung 2.8: Übersicht über das humane Kinom

Sequenzähnlichkeiten zwischen Proteinkinasedomänen sind abgeleitet aus publizierten Sequenzen und Genvorhersagemethoden. Die für diese Arbeit relevanten Kinasen und die einzelnen Hauptgruppen sind hervorgehoben: AGC (umfasst die PKA, PKG, PKC Familien), CAMK (Calcium/Calmodulinabhängige Proteinkinase), CK1 (Casein Kinase 1), CMGC (umfasst die Cdk, MAPK, GSK3, CLK Familien), STE (Homologe der Hefekinasen Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20), TK (Tyrosinkinase), TKL (Tyrosinkinase-ähnliche, engl.: *tyrosine kinase-like*), GYC (Rezeptor-Guanylat-Cyclase). Atypische Kinasen sind nicht eingezeichnet (Manning et al., 2002).

2.4.1 Strukturelle Eigenschaften von Kinasen

Durch Sequenzvergleiche und zahlreiche kristallographische Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl in Cdks als auch in MAP-Kinasen die katalytische Domäne konserviert ist (Endicott et al., 2012). Dieser 200-250 Aminosäure lange katalytische Kern besteht aus zwei Faltungsdomänen, die durch einen Gelenkbereich miteinander verbunden sind und zwischen denen das aktive Zentrum lokalisiert ist (Jeffrey et al., 1995; Russo et al., 1996a). Im Folgenden soll am Beispiel des strukturell gut verstandenen Cdk2/CycA Komplexes die wichtigsten Elemente in Proteinkinasen beschrieben werden (Abbildung 2.9).

Das aktive Zentrum der Kinase liegt zwischen dem aus einem β -Faltblatt und einer α -Helix bestehenden N-terminalen Flügel und dem hauptsächlich α -helikalen C-terminalen Flügel. Die charakteristische α -Helix im N-terminalen Flügel ist auch als α C-Helix bekannt und wird entsprechend der Abfolge ihrer Aminosäuresequenz auch als PSTAIRE-Helix bezeichnet. Die Flügel sind über einen als *Hinge*-Region bezeichneten Linker miteinander verbunden. Im N-terminalen Flügel befindet sich diese für Cdks charakteristische PSTAIRE-Helix, welche für die Regulation der Kinaseaktivität wichtig ist, sowie die Glycin-reiche Schleife, die die Konformation des ATPs stabilisiert. Der C-terminale Flügel enthält das Aktivierungssegment sowie das entsprechend seiner drei streng konservierten Aminosäuren benannte DFG-Motiv. Die hochkonservierte ATP-Bindungstasche liegt an der Verbindungsstelle zwischen dem N- und C-terminalen Flügel und präsentiert das γ -Phosphat des ATP zur geöffneten Seite der Tasche. Das Aktivierungssegment spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Kinase. Das DFG-Motiv vermittelt über die Chelatisierung von zwei Mg^{2+} -Ionen die korrekte Positionierung des ATPs im aktiven Zentrum der Kinase (Bao et al., 2011). Zwei hochkonservierten Aminosäuren, die als Mg^{2+} -Anker bezeichnet werden, stabilisieren zusammen mit den beiden Magnesiumionen Mg1 und Mg2 die Triphosphogruppe von „unten“, d.h. seitens der C-terminalen Domäne und stellen das Gegenstück zur ATP-Bindungsschleife dar. Mg2 wird fünffach koordiniert und ist α - und γ -Phosphogruppe verbrückt. Mg1 besitzt eine Koordinationssphäre aus sechs Sauerstoffatomen, darunter je eines aus der β - und γ -Phosphogruppe.

Alle der MAP und Cdk Familie gehörenden Kinasen besitzen nahe der γ -Phosphogruppe zwei absolut konservierte Aspartatseitenketten. Dabei dient eines als Mg^{2+} -bindendes Aspartat, denn seine Seitenkette wirkt als zweizähliger Ligand für Mg1 und ist gleichzeitig koordinativ an Mg2 gebunden. Aufgrund derartiger funktioneller Unterschiede hat man das an der Mg1-Bindungsstelle gebundene Metallion auch als „aktivierendes“ Metallion bezeichnet im Gegensatz zum „inhibitorischen“ Metallion an der Mg2-Bindungsstelle (Adams, 2001).

Die meisten Helices der C-terminalen Domäne sind konserviert. Eine Ausnahme bilden die Helices α H, α I und α J. Bei ihnen handelt es sich um eine Art „Subdomäne“, die für die Faltung der C-terminalen Domäne nicht essentiell ist. Diese Insertion kommt auch bei den MAP-Kinasen vor. Ihre Funktion ist weitgehend unbekannt, lediglich im Falle der

inaktiven, nicht-phosphorylierten Form der MAP-Kinase Erk2 wurde gezeigt, dass dieser Bereich mit der sogenannten Aktivierungsschleife wechselwirkt und so die inaktive Form des Enzyms stabilisiert wird (Canagarajah et al., 1997; Zhang et al., 1994). Die Funktionen der konservierten Helices in der C-terminalen Domäne sind nicht unmittelbar ersichtlich, denn keine der katalytischen Schlüsselaminosäuren ist in ihnen lokalisiert. Es scheint, als ob der helikale Grundkörper der Domäne in seiner Gesamtheit als stabilisierende Basis für die mechanistischen Schlüsselteile dient, die sich im Bereich der kleinen Faltblattmotive und der Aktivierungsschleife befinden. Neben der Kinaseuntereinheit benötigen die Cdk Kinasen die für ihre Aktivität entscheidende Cyclin-Untereinheit (Morgan, 1997).

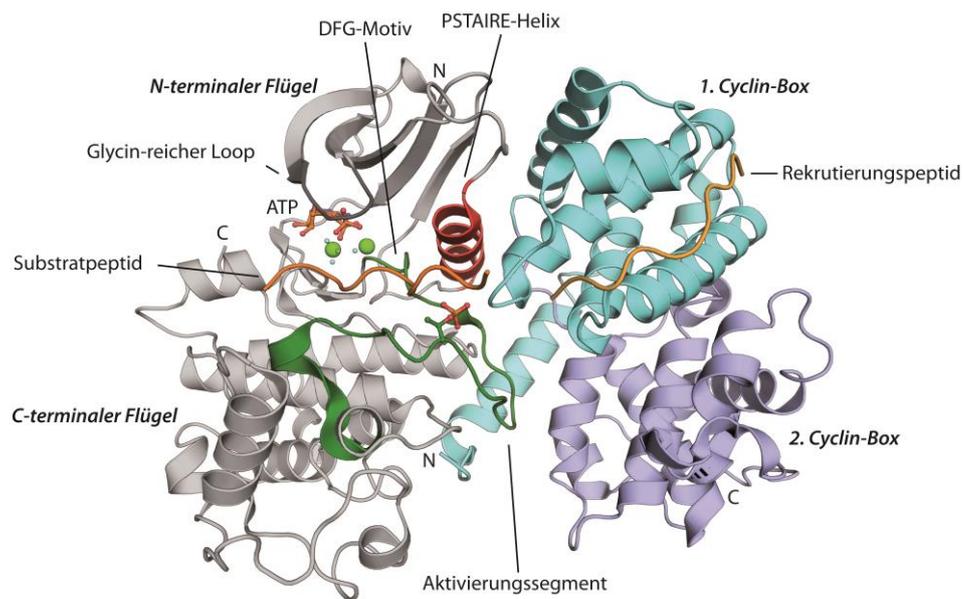


Abbildung 2.9: Kristallstruktur von Cdk2/CycA mit ADP•MgF₃•zwei Mg²⁺ und Substrat-Rekrutierungspeptid

Konservierte Elemente in Cdk/Cyc-Komplexen (PDB: 1QMZ/3QHR; (Bao et al., 2011)) sind farblich hervorgehoben und entsprechend beschriftet (Bösken, 2013).

Cycline bestehen aus zwei kanonischen Cyclin-Box Strukturen, welche sich aus jeweils fünf Helices und zwei kurzen N- bzw. C-terminalen Helices zusammensetzen. Die erste Cyclin-Box ist hochkonserviert und bindet an die Cdk-Untereinheit. In Cdk2 interagiert die Cyclin-Untereinheit mit den beiden Flügeln der Kinase, allerdings variiert diese Interaktion bei verschiedenen Cdk-Cyclin Komplexen deutlich (Baumli et al., 2008; Brown et al., 1999; Cheng et al., 2006; Echalié et al., 2010; Jeffrey et al., 1995; Lowe et al., 2002; Russo et al., 1996b; Takaki et al., 2009). Die N- und C-terminalen Helices flankieren die Cyclin-Boxen und spielen eine besondere Rolle für die Aktivität und Spezifität der verschiedenen Cycline (Noble et al., 1997). Die Aminosäurereste im aktiven Zentrum aber auch davon ausgegliederte Bereiche vermitteln die jeweilige Spezifität. Daher wird der C-terminale Teil der Aktivierungsschleife in Proteinkinasen auch als „(p+1)-Schleife“ bezeichnet. Der Name geht auf die Tatsache zurück, dass in diesem Bereich die Seitenkette der (p+1)-Aminosäure

bindet, die auf das zu phosphorylierende Serin, Threonin oder Tyrosin (Position „p”) folgt. Diese (p+1)-Aminosäure ist bei allen Kinasen wichtig für die Substraterkennung.

Cdks besitzen generell eine starke Präferenz für Substrate mit einem Prolin an Position +1. Die Bindung des Prolins wird von einer hydrophoben Tasche am aktiven Zentrum der Kinase vermittelt. Diese entsteht beispielsweise innerhalb der Kinase Cdk2 aus einer über die Phosphorylierung des Aktivierungssegments ausgelösten, charakteristischen Orientierung von Val163 und Val164 (Brown et al., 1999). Des Weiteren wird eine basische Aminosäure an der Position +3 des Substrats in Zellzyklus-Cdks wie Cdk2 bevorzugt über Interaktionen mit pThr160 im Aktivierungssegment sowie der Hauptkette von Ile270 auf CycA erkannt (Brown et al., 1999). Diese Präferenz scheint in Transkriptions-Cdks nicht vorhanden zu sein, da CTD Substrate keine basischen Aminosäurereste an dieser Stelle besitzen. Abweichungen der intermolekularen Assemblierung der Untereinheiten innerhalb des Cdk-Cyclin Komplexes könnten möglicherweise ein entscheidender Grund für die veränderte Substratspezifität sein (Echalier et al., 2010). Die Aktivierung der MAP Kinasen findet durch eine vorgeschaltete Kinase in der Signalkaskade statt und wird als MAP/Erk Kinase (MEK) bezeichnet.

2.4.2 Erk1 und Erk2

Viele extrazelluläre Stimuli in eukaryotischen Zellen werden durch konservierte Signaltransduktionsmechanismen, Mitogen-aktivierte Kinasen (MAP) oder extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (Erk) übertragen. Der MAP-Kinase-Weg wird durch Enzyme durchgeführt, die cytoplasmatische Prozesse, Gen-Aktivierung und andere intrazelluläre Prozesse regulieren. Obwohl der regulatorische Mechanismus variieren kann, bleibt die Gesamtorganisation des MAP-Kinase-Wegs gleich. Er enthält eine drei-Kinase-Kaskade, bei der eine MAP/Erk-Kinase-Kinase (MEKK) eine MAP/Erk-Kinase (MEK) aktiviert, die wiederum eine Erk oder MAP Kinase aktiviert (Khokhlatchev et al., 1997). Die durch extrazelluläre, Signale regulierten Kinasen sind Mitglieder der großen Familie der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen, zu der auch Erk5, die c-Jun NH₂-terminalen Kinasen (JNK) und die p38-MAP-Kinasen gehören (Avruch, 2007). Die konservierte MAP Kinase Erk ist eine wichtige Kinase der Genexpression. Sie wurde als effiziente RNAP II CTD Kinase beschrieben, deren Aktivität zuerst in Serum-stimulierten Maus-Fibroblasten (Dubois et al., 1994) und während der Meiose in *Xenopus* (Bellier et al., 1997) gefunden wurde. Ein typisches Phosphorylierungsmuster von Erk ist ProXaaSer/ThrPro. Auf der CTD ist Erk als Ser5 Kinase beschrieben und wird durch Wachstumsfaktoren und Mitogene aktiviert (Bonnet et al., 1999; Trigon et al., 1998).

Obwohl Erk als CTD Kinase identifiziert werden konnte, wurden deren Erkennungsmuster innerhalb der CTD sowie die Substratspezifität bisher nicht näher analysiert. In Studien zu Erk wurde gezeigt, dass durch osmotischen und oxidativen Stress oder durch Serum Stimulation eine neue phosphorylierte Untereinheit der CTD entsteht, die IIm Form. Diese

Im Form konnte *in vivo* durch Erk-MAP-Kinase-Phosphorylierungen generiert werden und liegt unterhalb der hyperphosphorylierten Ilo Form. Die Immunreaktivität der Im Form zeigt gegen einen monoklonalen Antikörper ebenfalls eine Ser-5 Phosphorylierung. Außerdem bleibt die Bildung der Im-Form aus, wenn die Erk-Aktivierung durch spezifische Inhibitoren von MEK1/2 verhindert wird. Da die Im-Form nicht durch die Inhibition der Transkription beeinflusst wird und nicht an Chromatin gebunden ist, könnte es sein, dass diese Form keinen Einfluss auf die Transkription ausübt (Bonnet et al., 1999). Die in der MAP-Kinase Kaskade enthaltene und aktivierende GTPase Ras führt zudem zu einer gesteigerten Bildung des Genregulatorproteins c-Myc (Gupta and Davis, 1994; Sears et al., 2000), worauf in Abschnitt 2.6 näher eingegangen werden soll.

2.4.3 Cdk12/CycK und Cdk13/CycK

Cyclin abhängige Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von vielen zellulären Prozessen wie dem Zellzyklus, neuronalen Entwicklungen, der Transkription und der posttranskriptionalen Prozessierung. Die Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) besteht aus 21 Proteinen. Die Aktivierung dieser Kinasen erfordert, wie bereits erwähnt, die Interaktion mit spezifischen Cyclin Partnern und die Phosphorylierung der T-Schleife im Aktivierungssegment der Cdks durch Cdk-aktivierende Kinasen (CAKs) (Malumbres et al., 2009). Die ersten beschriebenen Cdks waren Regulatoren des Zellzyklus, wie Cdk1, Cdk2, Cdk4 und Cdk6 (Malumbres et al., 2009). Eine weitere Gruppe von Cdk/Cyc Komplexen, wie Cdk7/CycH und Cdk9/CycT1 weisen Zellzyklus unabhängige Aktivitäten auf. Neuere Arbeiten führten zur Charakterisierung neuer Transkriptionszyklus bezogener Cdk Komplexe: Cdk12/CycK und Cdk13/CycK (Bartkowiak et al., 2010; Blazek et al., 2011).

Cdk12 und Cdk13 wurden erstmals in cDNA-Screens für Zellzyklusregulatoren identifiziert. Anhand von Sequenzvergleichen konnte eine Verwandtschaft zwischen Ctk1 aus *S. cerevisiae* und Cdk12 bzw. Cdk13 festgestellt werden (Guo and Stillier, 2004, 2005; Ko et al., 2001; Liu and Kipreos, 2000). Cdk12 beinhaltet 1490 Aminosäuren und Cdk13 1512 Aminosäuren, mit einer konservierten zentralen CTD Kinasedomäne und einer degenerierten RS Domäne in der N- und C-terminalen Region (Even et al., 2006). Die Cyclin Untereinheit ist bei beiden Kinasen mit Cyclin K die selbe, die eine Prolin-reiche C-terminale Region beinhaltet und zwei N-terminale Cyclin Boxen (Bartkowiak et al., 2010; Edwards et al., 1998). Cdk12 und Cdk13 enthalten außerhalb der Kinasedomäne eine C-terminale Helix, die mit den uncharakterisierten N- und C-terminalen Bereichen und der Riboseeinheit von ATP interagiert. Diese konservierte Helix, die die Interaktion durch ein HE-Motiv gefolgt von einem polybasischen Cluster vermittelt, ist essentiell für die Aktivität der Kinase. Die T-Loop-Phosphorylierung von Cdk12 und Cdk13 erfordert eine Coexpression mit einer Cdk-aktivierenden Kinase, CAK, und der Cyclin K Untereinheit (Bösken et al., 2014).

Die humane Cdk12 Kinase phosphoryliert Ser2 der CTD RNAP II *in vitro* und *in vivo*. Cdk13 phosphoryliert die CTD RNAP II ebenfalls an Ser2 *in vitro* (Bartkowiak et al., 2010; Blazek et al., 2011). Allerdings haben neuere Studien gezeigt, dass die Position der Phosphorylierung noch nicht genau geklärt ist. *In vitro* wurde sowohl für Cdk12/CycK als auch für Cdk13/CycK eine Phosphorylierung an Position Ser5 gezeigt (Hönig, 2013; (Bösken et al., 2014), dabei zeigen beide Kinasen die höchste Aktivität auf einem Ser7 vorphosphoryliertem CTD Substrat (Bösken et al., 2014). Bislang ist Flavopiridol, welcher ein potenter Inhibitor für Cdk9/CycT1 ist, auch der bis jetzt stärkste Inhibitor für Cdk12, der gefunden wurde. Flavopiridol zeigt jedoch eine 10-fach schwächere Inhibition im Vergleich zu Cdk9/CycT1 (Bösken et al., 2014). Die Funktionalität von Cdk12/CycK liegt unter anderem in der genomischen Stabilität (Blazek, 2012). Da Cdk12 überwiegend in Bereichen des Zellkerns vorliegt, an denen auch pre-mRNA Spleißfaktoren angereichert sind, vermittelt Cdk12 die korrekte Rekrutierung der Spleißfaktoren an die CTD (Chen et al., 2006; Ko et al., 2001; Lamond and Spector, 2003). Es hat sich gezeigt, dass Cdk12/CycK die Genomstabilität durch die Regulation der Expression von mehreren wichtigen DNA-schädigenden Genen (DDR, engl.: *DNA damage response*) unterstützt (Blazek et al., 2011). Dabei führt der Verlust von Cdk12 zu vielseitigen Schäden der DNA (Blazek, 2012).

Cdk13/CycK ist im alternativen Spleißmechanismus von HIV-1 involviert (Riggs et al., 1994), indem es das Spleißen des viralen Genoms erhöht und so z.B. die Produktion von Nef (engl.: *negative factor*) fördert. Das HIV Protein Tat wird in infizierten Zellen angereichert, worauf in Abschnitt 2.5.3 näher eingegangen wird. Diese Anreicherung führt zu der Bildung eines inhibierten Komplexes mit Cdk13 (Petersen-Mahrt et al., 1999), dessen Funktion, die beim Spleißen involvierten Proteine AFS/SR2 (siehe Abschnitt 2.4.6) zu phosphorylieren, ausbleibt. Aus der Inhibierung des Spleißens resultiert eine erhöhte Produktion von mRNA, die charakteristisch für die späte Phase des Viruszyklus ist. Weitere Funktionen von Cdk13/CycK sind noch nicht geklärt. Es liegt allerdings nahe, dass Cdk13/CycK und Cdk12/CycK ähnliche Funktionen im Metabolismus der Zellen aufweisen.

2.4.4 CdkF/CycH

CAK1At (CdkF;1) wurde als erstes in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* gefunden und ist als Suppressor der CAK1 Mutation in Bäckerhefe identifiziert worden (Umeda et al., 1998). CAK1At aus *Arabidopsis* wurde später als CdkF;1 bezeichnet, nach den Nomenklaturregeln für Cdks durch Vandepoele et al. (2002). Das Genom der Pflanze *Arabidopsis thaliana* kodiert für vier potentielle CAKs, die zu zwei verschiedenen Arten von CAKs, CdkD und CdkF, gehören. Dabei sind CAK2At (CdkD;3/CAK2), CAK3At und CAK4At (CdkD;2/CAK4) eng mit dem CAK aus Wirbeltieren, der Cdk7/p40^{MO15} Kinase und Kin28 verwandt (Barrero et al., 2002). Sie formen verschiedene TFIIH abhängige Komplexe mit Cyclin H, TFIIH-2 und MAT1 (Shimotohno et al., 2006; Shimotohno et al., 2004; Van

Leene et al., 2010). CdkF;1 scheint spezifisch für das Pflanzenreich zu sein und ist neben CdkD;2 sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (Shimotohno et al., 2004). CdkF;1 ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und des Zellwachstums (Takatsuka et al., 2009).

CdkF;1 zeigt nur eine geringe funktionelle und sequentielle Ähnlichkeit zu Cdk7. Im Gegensatz zu den CAKs aus Wirbeltieren zeigte sich zunächst nur eine Cdk aktivierende Kinase-Aktivität, aber keine CTD Kinase-Aktivität *in vitro* (Umeda et al., 1998). CdkF;1 ist eine Untereinheit eines Proteinkomplexes, der den T-loop von CAK2At (CdkD;3) und CAK4At (CdkD;2) phosphoryliert und die CTD Kinaseaktivität von CAK4At *in vitro* aktiviert (Shimotohno et al., 2004; Umeda et al., 2005). Diese Ergebnisse legten nahe, dass CdkF;1 eine neuartige CAK-aktivierende Kinase ist, die die Aktivität von CAK2At und CAK4At moduliert, wodurch die Cdk Aktivitäten und die basale Transkription in *Arabidopsis* gesteuert wird (Shimotohno et al., 2004). Erst 2012 konnte gezeigt werden, dass CdkF;1 ebenfalls eine RNAP II CTD Phosphorylierung aufweist. Die CTD der RNAP II in *Arabidopsis* beinhaltet 15 consensus und 26 Varianten der Heptapeptid-Wiederholungen (Nawrath et al., 1990). CdkF;1 konnte in Pflanzen als spezifische pSer7 CTD Kinase identifiziert werden (Hajheidari et al., 2012). Die Inhibition von CdkF;1 hat eine fehlende cotranskriptionale und transkriptionale Prozessierung von miRNAs, siRNAs und einigen RNAs von Schlüsselkomponenten zur Folge (Hajheidari et al., 2012; Hajheidari et al., 2013).

Bisher ist wenig über die Spezifität, Phosphorylierungsposition und Regulation der CTD Kinase bekannt. In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob und an welcher Position CdkF;1 die RNAP II CTD *in vitro* phosphoryliert und welche weiteren Eigenschaften die Kinase möglicherweise aufweist.

2.4.5 c-Abl

Die c-Abl Proto-Oncogene kodieren für eine Tyrosinkinase, die im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist. c-Abl enthält eine DNA Bindungsdomäne, die für die Interaktion mit Chromatin zuständig ist (Kipreos and Wang, 1992; Wang and McWhirter, 1994) und ein Signal für den Kerntransport trägt (Wang and McWhirter, 1994). Die Lokalisierung von c-Abl in Chromatin führt zu der Annahme, dass c-Abl auch andere DNA bindende Proteine phosphorylieren kann. So wurde die Tyrosin-Phosphorylierung der RNAP II durch c-Abl gefunden (Baskaran et al., 1993). In vielen Fällen werden die Substrate von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen über die Interaktion von SH2-Domänen an Tyrosin-phosphorylierte Rezeptoren vermittelt (van der Geer and Hunter, 1994; Wang and McWhirter, 1994). Bei c-Abl ist die Phosphorylierung ebenfalls abhängig von der SH2 Domäne und einer CTD Interaktionsdomäne (CTD-ID) in der C-terminalen Region von c-Abl (Baskaran et al., 1996). Die CTD-Tyrosin-Phosphorylierung wird nicht von anderen Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel c-Src, katalysiert (Duyster et al., 1995). So scheint eine spezifische

Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase c-Abl vorzuliegen. Die Kinase liegt in einem basal inaktiven Zustand vor und wird durch DDR-Gene aktiviert. Für die Inaktivierung wird der N-terminale Teil des Proteins und der Myristylrest verantwortlich gemacht (Lin et al., 2007). c-Abl kann durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie beispielsweise den EGF-Rezeptor (engl.: *epidermal growth factor receptor*) und durch Nicht-Rezeptortyrosinkinasen wie c-Src (engl.: *cellular and sarcoma*) aktiviert werden (Srinivasan and Plattner, 2006).

2.4.6 Spleißkinasen und -faktoren

Die beiden humanen Kinasen Dsk1 und SRPK1 gehören zu den Serin/Arginin Proteinkinasen, die spezifisch Serin/Arginin-Proteine (SR-Proteine), die zu der Familie der Spleißfaktoren gehören, phosphorylieren. Spleißfaktoren weisen am C-terminus häufig eine Serin/Arginin-reiche Domäne und am N-terminus ein RNA Bindungsmotiv auf (RRM, engl.: *RNA recognition motif*) (Shen et al., 2004). Sie sind in Speckles im Zellkern während der Interphase konzentriert (Fu and Maniatis, 1990) und werden als Antwort während der Transkription inhibition (Carmo-Fonseca et al., 1992; Dundr and Misteli, 2010; O'Keefe et al., 1994; Singer and Green, 1997) oder während viraler Infektionen ausgeschüttet (Jimenez-Garcia and Spector, 1993). Durch das Aufbrechen der nuklearen Speckles wird der Zellfortschritt während der Mitose verbessert (Misteli et al., 1998; Spector et al., 1991). Die Phosphorylierung der Spleißfaktoren ist eine Voraussetzung für die Dissoziation des Proteins aus den nuklearen Speckles und für die Rekrutierung an transkriptionsaktive Bereiche (Misteli et al., 1998).

Die Kinasen SRPK1 und Dsk1 sind sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert und nehmen bei der Regulation von konstitutiven und alternativen Spleißen eine wichtige Rolle ein. SRPK1 induziert spezifisch den Abbau von nukleären Speckles und inhibiert in hoher Konzentration das Spleißen. Dies zeigt, dass SRPK1 eine zentrale Rolle im regulatorischen Netzwerk des Spleißens aufweist, eine Kontrolle auf die intrazelluläre Verteilung der Spleißfaktoren während der Interphase ausübt und Einfluss auf die Bildung nukleärer Speckles während der Mitose nimmt (Gui et al., 1994). Dsk1 ist eine Kinase für die Homologe in vielen eukaryotischen Organismen identifiziert und die Proteinsequenz bestimmt wurde. Sie wird während der Interphase im Cytoplasma und während der Mitose im Zellkern gefunden. Die Expression von Dsk1 verzögert den Eintritt in die Mitose, wenn Zellen in der G2 Phase sind, und beschleunigt den Austritt, wenn die Zellen in der M-Phase des Zellzyklus sind. Beide Kinasen können Spleißfaktoren wie das SRSFII Protein phosphorylieren.

SR-Proteine sind eine Familie von RNA-bindenden Proteinen, die sowohl beim konstitutiven als auch beim alternativen Spleißen der pre-mRNA (Lin and Fu, 2007) in mehreren Schritten des RNA-Metabolismus in Säugerzellen beteiligt sind (Velazquez-Dones et al., 2005; Zhong et al., 2009). Das SR Protein SRSFII, welches ursprünglich als SC35 bekannt war, ist an der Rekrutierung von P-TEFb zum Genpromotor und anderer

wichtiger Faktoren, die die Transkriptionselongation erleichtern, beteiligt (Xiong et al., 2013). SRSFII ist mit den Gen-Promotoren als Teil des 7SK-Komplexes assoziiert und vermittelt zusammen mit der Purin reichen RNA ESE die Freisetzung von P-TEFb aus dem inhibierten 7SK-Komplex (Xiong et al., 2013). Diese Studien zeigen eine ähnliche aktivierende Rolle wie das HIV Protein Tat, dessen Einfluss auf die Transkription mit der promotor-assoziierten RNA TAR verbunden ist (beschrieben in Abschnitt 2.5.3; Esteller, 2011). Verschiedene genomweite Studien haben gezeigt, dass kurze Transkripte mit der TSS (engl.: *transcription start site*) assoziiert sind, deren funktionelle Bedeutung bis jetzt noch unklar ist (Esteller, 2011). Die Tat-abhängige Genexpression zeigt die Bedeutung des Promotor-proximalen TAR-Elements für die Transkriptionsaktivierung, aber es ist bis heute unklar, ob es sich hierbei um einen weit verbreiteten Mechanismus zur Aktivierung von zellulären Genen handelt. Es konnte jedoch auch bei der SRSFII abhängigen Transkriptionsaktivierung eine Verbindung mit der Promotor-proximalen RNA ESE gefunden werden (Xiong et al., 2013). Die Rekrutierung von P-TEFb zur pausierenden RNAP II durch SRSFII scheint mit dem Chromatin-gebundenen Aktivator Brd4 verbunden zu sein (Abbildung 2.10).

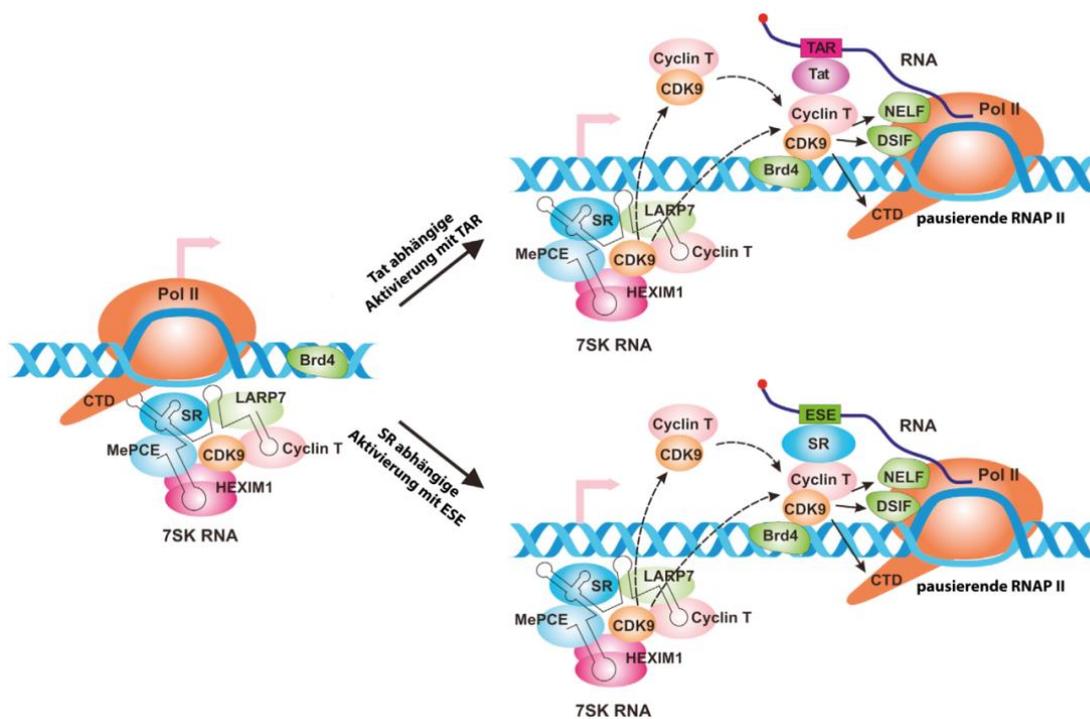


Abbildung 2.10: Modell für die SR-abhängige Transkription im Vergleich zu Tat

SR-Proteine und der 7SK RNA-Komplex sind mit genomischer DNA in der Nähe des Promotor-proximalen Bereichs verbunden. Dies ermöglicht ein effizientes lokales Umschalten während der Gen-Aktivierung. Die Tat-abhängige Aktivierung des HIV-1 Promotors induziert die TAR Bindung und so die Verlagerung von P-TEFb vom inhibierten 7SK Komplex zum pausierenden RNAP II Komplex (oben). Dies wird durch eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Tat und Cyclin T1 und zwischen Brd4 und Cdk9 erleichtert. Zurzeit ist es unklar, ob P-TEFb direkt zur RNAP II rekrutiert wird oder indirekt über einen nukleoplasmatischen Pool (gestrichelte Linien). Das SR-Protein ist ebenfalls während des Promotor-proximalen Pausierens Teil des 7SK RNA-Komplexes. SRSFII wirkt mit der RNA ESE über einen ähnlichen Mechanismus wie Tat, der zu der Freisetzung von P-TEFb führt. Sowohl bei der Tat/TAR als auch bei der SR/ESE Aktivierung kann durch das Chromatin-gebundene Brd4 Protein die Assoziation von P-TEFb mit RNAP II an der TSS verbessert werden (Xiong et al., 2013).

Es soll in dieser Arbeit gezeigt werden, welchen Einfluss SRSFII auf den inhibierten Komplex hat und wie die Aktivierung der Transkription durch SRSFII bewerkstelligt wird. Zudem soll das Phosphorylierungsverhalten von Spleißkinasen neben der Phosphorylierung von SR Proteinen auf die CTD der RNAP II analysiert und die Phosphorylierung von SRSFII durch andere Kinasen untersucht werden.

2.5 Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb)

Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb) gehört zu der Cdk-Familie aus der CMGC-Gruppe (Cdk, MAPK, GSK3, CLK Familie) der eukaryotischen Proteinkinasen (Abbildung 2.8). Die Aktivierung der Zellteilung und die Übergänge zwischen verschiedenen Phasen des Zellzyklus werden durch Cdks, die als Serin/Threonin-Proteinkinasen bekannt sind, gesteuert. Das typische Sequenzmotiv von Cdks beinhaltet die kanonische Aminosäuresequenz (Ser/Thr)ProXaa(Lys/Arg) (Brown et al., 1999; Holt et al., 2009; Songyang et al., 1994). Sowohl dem Prolin an Position +1, sowie einem basischen Aminosäurerest an Position +3 kommen in der Substraterkennung dabei wichtige Rollen zu (Brown et al., 1999; Holt et al., 2009; Songyang et al., 1994). P-TEFb besteht aus den zwei Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (Cdk9) und dem regulatorischen Cyclin T1 (CycT1) (Peterlin and Price, 2006). Neben CycT1 wurde auch CycT2 als Bindungspartner für Cdk9 identifiziert (Peng et al., 1998). Die Aktivierung von P-TEFb erfordert neben der Bindung der Cyclin Untereinheit die Phosphorylierung des konservierten Thr-Restes im Aktivierungssegment, dem T-loop, an Position 186 (Chen et al., 2004; Li et al., 2005). Diese Phosphorylierung, die für die ATP Bindung essentiell ist, wird durch CAKs katalysiert (Kaldis, 1999). CycT1 besitzt N-terminal kanonische Cyclin-Boxen und einen größtenteils unstrukturierten C-Terminus, der eine *coiled-coil* Region (379-430), eine Histidin-reiche Domäne (506-530) und eine C-terminale PEST-Sequenz (709-726) enthält (Wei et al., 1998). Cdk9 besteht aus einer typischen eukaryotischen Proteinkinasedomäne mit N- und C-terminalen Flügeln (Grana et al., 1994).

P-TEFb wird in der Regulation der Transkription und der posttranskriptionalen mRNA-Prozessierung benötigt in der Funktion die CTD der RNAP II und andere Transkriptionsregulatoren wie DSIF oder NELF zu phosphorylieren. Die Rekrutierung von P-TEFb zum Promotor aktiviert die Genexpression durch die Serin Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNAP II (Lis et al., 2000). Der Arrest, der von den negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF hervorgerufen wird, limitiert die RNA Pol II Prozessivität und wird von P-TEFb durch deren Phosphorylierung aufgehoben (Marshall and Price, 1995). Dabei vermittelt P-TEFb den Übergang in die Phase der produktiven Elongation. Studien zur Spezifität von P-TEFb die CTD zu phosphorylieren zeigen sowohl eine Ser2 (Bres et al., 2008; Egloff et al., 2012; Heidemann et al., 2012; Ni et al., 2004; Peterlin and Price, 2006; Shim et al., 2002; Zhou et al., 2000), als auch eine Ser5 und Ser7

(Czudnochowski et al., 2012; Glover-Cutter et al., 2009; Ramanathan et al., 2001) Phosphorylierung.

P-TEFb kann über Phosphorylierung und Acetylierung seiner beiden Untereinheiten reguliert werden. Durch Ubiquitinylierung, einer posttranslationalen Modifikation, kann die Degradation von CycT1 induziert werden (Kiernan et al., 2001; Morgan, 1997). Diese posttranslationalen Modifikation beeinflussen entweder die Aktivität von P-TEFb direkt oder aber deren Assoziation mit seinen Interaktionspartnern (Cho et al., 2010). Darüber hinaus unterliegt die CycT Konzentration einer strengen Expressionskontrolle (Morgan, 1995).

DRB und Flavopiridol sind bekannt als Inhibitoren für P-TEFb. Dabei sind die beiden Inhibitoren ATP Analoge, die die aktive Bindungstasche von P-TEFb blockieren und so fast die komplette RNAP II abhängige Transkription im Menschen inhibieren (Chao and Price, 2001). Die Inhibition von P-TEFb kann sogar zur allgemeinen Abnahme der RNA Pol II Dichte auf Genen führen und zu falscher 3'-Prozessierung, was wiederum die wichtige Rolle der Phosphorylierung in der Koordinierung der verschiedenen Abläufe widerspiegelt. Um auf die Transkription einzuwirken, muss P-TEFb zu der RNA Pol II gelangen. Einzelne spezifische Aktivatoren sind bekannt, P-TEFb zu Transkriptions-komplexen zu rekrutieren und zu aktivieren (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Neben der Aktivierung unterliegt P-TEFb einer Inhibition, die mit der Bildung des großen inhibierten 7SK snRNP Komplexes verbunden ist.

2.5.1 Inhibition durch Hexim

Der inhibierte P-TEFb Komplex besteht aus der 7SK snRNA, die als Gerüst dient, dem La-ähnlichen Protein Larp7, das die RNA vor Abbau schützt, Hexim1 oder Hexim2 und dem 5'-Capping Protein MePCE (Abbildung 2.11; Lebars et al., 2010; Prasanth et al., 2010; Xue et al., 2010). Neuere Studien haben gezeigt, dass auch der SR-Spleißfaktor SRSFII in dem inhibierten Komplex vorhanden ist (Ji et al., 2013). Dieser Komplex ist damit ca. 400 kDa groß und wird als 7SKsnRNP bezeichnet. Hexim1 in den Grenzen 200-359 wurde als hinreichend für die *in vitro* Inhibition von P-TEFb beschrieben (Czudnochowski, 2009).

Hexim1 befindet sich sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma, wobei es in beiden Fällen generell mit RNA assoziiert ist (Li et al., 2007). Der genaue Mechanismus der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 ist bis heute nicht vollständig geklärt. Eine 105 Aminosäure lange Dimerisierungssequenz in den Grenzen 255-359 von Hexim1 vermittelt die Bindung an CycT1 und wird daher auch Cyclin T1-bindende Domäne genannt (TBD). (Czudnochowski, 2009; Schulte et al., 2005). Durch einen Leucin-*Zipper* bildet die TBD eine parallele *coiled-coil*-Struktur aus, welche die Dimerisierung von zwei Hexim Molekülen bewirkt (Dames et al., 2007; Schonichen et al., 2010). Dieses Segment ermöglicht eine unabhängige Bindung von Hexim an die N-terminalen Cyclin-Boxen von CycT1 (Bigalke et al., 2011; Michels et al., 2004). Allerdings ist für die vollständige

Inhibition die 7SK snRNA notwendig. Diese kleine nukleäre RNA dient als Gerüst für die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb (Michels et al., 2003; Yik et al., 2003). RNAs liegen in der Zelle immer als Einzelstrang vor, was zu einer Ausbildung von intramolekularen Wechselwirkungen führen kann und so zu einer Bildung von komplexen, dreidimensionalen Strukturen. Eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS, 150-177) dient als Bindungsstelle für die 7SK snRNA (Barboric et al., 2005; Yik et al., 2003; Yik et al., 2004). Für die Inhibition wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Bindung der 7SK snRNA mit Hexim1 zu einer Konformationsänderung führt, die die Cyclin T1-Bindungsdomäne in Hexim1 für die P-TEFb Bindung zugänglich macht (Yik et al., 2004). Ein anderer Mechanismus, der vergleichbar mit der p27^{Kip} Inhibition des Cdk2/Cyclin A-Komplexes ist, schlägt die Bindung eines Tyrosinrestes in die ATP-Bindungs tasche der Kinase vor (Li et al., 2005; Michels et al., 2004). Im Falle der Zellzyklus Kinase Cdk2/CycA wird der Inhibitor über ein RXL-Motiv an die Cyclin-Untereinheit gebunden und positioniert dabei ein konserviertes Tyrosin in die ATP-Bindetasche der Cdk (Pavletich, 1999). N-terminal von der Hexim1 TBD, welche die Rolle des RXL-Motivs durch Bindung an Cyclin T1 einnimmt, befinden sich mehrere Tyrosine, die für die Inhibition verantwortlich sein könnten. Inhibitionsstudien haben ergeben, dass in der Tat ein hochkonserviertes PYNT-Motiv an der Kinaseinhibition beteiligt ist (Michels et al., 2004). Zusätzlich ist für die Assoziation die Phosphorylierung von Cdk9 an Thr186 essentiell (Chen et al., 2004; Li et al., 2005). Ebenfalls sind Threonin- und Phenylalaninreste von Hexim1 für die Interaktion notwendig, deren Rolle jedoch ungeklärt ist (Czudnochowski, 2009; Li et al., 2005; Michels et al., 2004).

Bei der Aktivierung der Kinase wird der inaktive 7SK snRNA Komplex durch eine kompetitive Verdrängung von der Kinase dissoziiert (Abbildung 2.11). Nun liegen die Komponenten jedoch nicht frei vor, sondern werden Teil eines Komplexes (Van Herreweghe et al., 2007). Diese Aktivierung von P-TEFb kann unter anderem durch das Aktivatorprotein Brd4 vermittelt werden.

2.5.2 Aktivierung von P-TEFb durch Brd4

Brd4 ist ein Bromodomänen-enthaltendes Protein. Beim Menschen gibt es insgesamt 61 unterschiedliche Bromodomänen. Diese Bromodomänen sind evolutionär konserviert und in 46 verschiedenen Proteinen vorhanden, die zu acht Familien gehören: Histonacetyltransferasen, ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplexe, Helikasen, Methyltransferasen, Transkriptions-Co-Aktivatoren, Transkriptionsmediatoren und die BET-Protein Familie (Filippakopoulos and Knapp, 2012; Müller et al., 2011). Brd4 ist ein ubiquitär exprimiertes Kernprotein, das zu der BET-Proteinfamilie gehört. Brd4 enthält zwei N-terminale Tandem Bromodomänen (BD1 und BD2) und eine extraterminale Domäne (ET) (Baskaran et al., 1996). Frühe Studien zeigten, dass die sehr konservierten Bromodomänen von Brd4 für die Bindung an Chromatin über acetylierte Histone verantwortlich sind (Dey et al., 2003). Acetylierte Histone sind ein wichtiges Merkmal von aktiv transkribierten Genen (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Die Bromodomänen

binden an die acetylierten Histone H3 und H4 und an acetyliertes Lysin in CycT1 und sind die einzig beschriebenen Interaktionsdomänen für Acetyllysine (Dey et al., 2003; Filippakopoulos and Knapp, 2012; Vollmuth et al., 2009). Der Übergang vom inhibierten P-TEFb Komplex in die aktive Form ist mit diesem Bromodomäne-enthaltendem Protein Brd4 verbunden und fördert die transkriptionsaktivierende Wirkung von P-TEFb (Abbildung 2.11; Bisgrove et al., 2007; Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Brd4 rekrutiert dabei P-TEFb zur Transkriptionsstelle in Abhängigkeit des posttranslationalen Modifikationsstatus der Histone. Die C-terminale Domäne von Brd4, die PID (engl.: *P-TEFb interacting domain*) interagiert mit P-TEFb und bewirkt so die Aktivierung von P-TEFb (Krueger et al., 2010; Schröder et al., 2012). Zudem ist auch eine Interaktion zwischen Brd4 und dem Mediator Komplex beschrieben (Jiang et al., 1998; Yang et al., 2005).

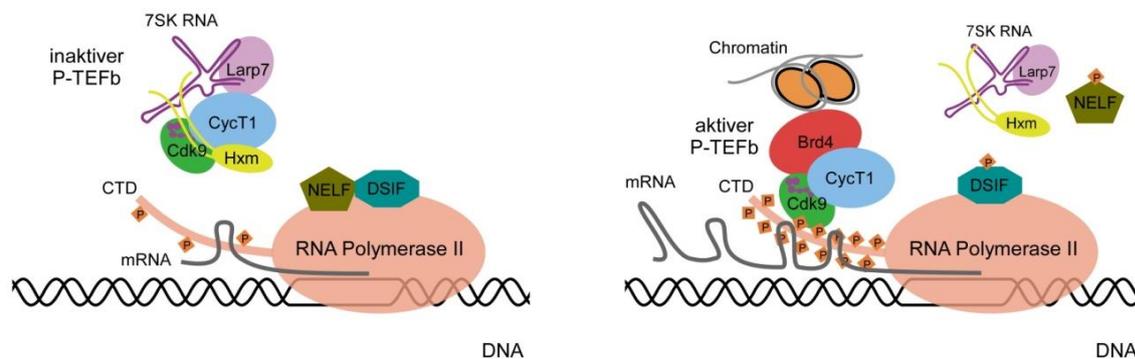


Abbildung 2.11: Inhibierung und Aktivierung von P-TEFb

P-TEFb liegt zu einem großen Teil als inaktiver Komplex mit Hexim, der kleinen, nukleären 7SK snRNA und dem Protein Larp7 vor. Durch die Bindung von Brd4 werden die Aktivierung von P-TEFb und die Freisetzung des snRNP herbeigeführt. P-TEFb wird dabei durch Brd4 an den Promotor rekrutiert (He et al., 2011; Zhou et al., 2011).

Auch Nicht-Histon-Proteine, wie das HIV-1 Tat Protein, können von Bromodomänen gebunden werden, welches in acetylierter Form interagiert (Hottiger and Nabel, 1998; Kiernan et al., 1999; Ott et al., 1999; Zeng et al., 2005). Es wurde eine Inhibition der Tat-abhängigen Transaktivierung durch den C-Terminus von Brd4 beschrieben (Bisgrove et al., 2007; Urano et al., 2008). Dabei wird das HIV Tat Protein durch die PID verdrängt, was einer Kompetition von Brd4 und Tat/TAR (engl.: *trans-activation response*) entspricht. Aus diesem Grund spielen Proteine, die der BET (Bromodomäne und extraterminale Domäne) Familie angehören, eine Rolle bei Krankheiten wie Krebs, Leukämie und viralen Infektionen (Delmore et al., 2011; Grayson et al., 2014; Mertz et al., 2011; Nicodeme et al., 2010; Schwartz et al., 2011; Zuber et al., 2011). Der genaue Mechanismus zur Aktivierung durch Brd4 ist bislang noch nicht gelöst.

2.5.3 Das HIV Protein Tat

Das aus dem Retrovirus stammende HIV Tat Protein ist ein regulatorisches Protein, das die Transkription des viralen Genoms drastisch erhöhen kann (Debaisieux et al., 2012). Das Virus integriert sein virales Genom in die DNA des Wirtes und lässt seine RNA und die Vorläufer-Proteine durch die Transkription und Translation des Wirts herstellen. Zunächst wird eine kurze RNA Sequenz synthetisiert, die hoch konservierte TAR RNA, bis es zum promotor-proximalen Pausieren kommt. Dabei dient die TAR RNA aller viralen Transkripte am 5'-Ende als RNA-basierter Promotor. Tat wirkt durch Bindung an diese RNA-Stamm-Schleifen-Struktur am 5'-Ende des initialen Transkripts. Durch die Bindung an TAR verändert Tat die Eigenschaften des Transkriptionskomplexes und zellulärer Faktoren. Indem Tat P-TEFb rekrutiert, wird die Phosphorylierung der RNAP II CTD stimuliert und die RNAP II in die produktive Elongation überführt (Herrmann and Rice, 1995; Isel and Karn, 1999; Mancebo et al., 1997; Ott et al., 2011; Wei et al., 1998; Zhu et al., 1997b). Durch diese positive Rückkopplung wird die Transkription aller HIV Gene erhöht (Kim and Sharp, 2001; Mujeeb et al., 1994). Die so hergestellten Viren können T-Zellen befallen und das Immunsystem schwächen, was über eine lange Zeitspanne hinweg zum Ausbruch von AIDS führt.

Die Bindung zwischen Tat und P-TEFb wird durch eine direkte Bindung der Schleife zwischen der 4ten und 5ten Helix der ersten Cyclinbox von CycT1 vermittelt (Anand et al., 2008; Tahirov et al., 2010). Diese Interaktion wird durch die kooperative Bindung der TAR RNA an Tat zu einer hochaffinen Bindung verstärkt (Wei et al., 1998; Zhang et al., 2000). Die α -helikale Kernregion von Tat ist dabei für die Bindung an die große Furche von TAR verantwortlich, die durch ein Arginin-reiches Motiv (ARM) vermittelt wird (Anand et al., 2008). Durch einen intermolekularen Zinkfinger von CycT1, der stark von den von CycT2 oder anderen C-Typ Cyclinen abweicht, ist die Spezifität der Interaktion gegeben (Bieniasz et al., 1999; Garber et al., 1998; Tahirov et al., 2010; Wimmer et al., 1999). Eine Deaktivierung der aktiven Transkription wird durch die Acetylierung von Tat an Lys50 durch die Acetyltransferasen p300 und PCAF (engl.: *p300/CBP-associated factor*) erreicht, die eine Dissoziation von TAR bewirken (Kaehlcke et al., 2003; Kiernan et al., 1999).

Trotz dieser Einblicke in die Struktur von Cdk9/CycT1/Tat/TAR ist der Mechanismus, mit welchem Tat/TAR die Phosphorylierung durch Cdk9 beeinflusst, weiterhin unklar. Eine Erweiterung der Substratspezifität von P-TEFb von Ser2 auf Ser2/Ser5 durch Tat wurde ausgeschlossen (Czudnochowski et al., 2012). Die chimären Proteine ELL2 und MLL wurde auch als Teil des Tat/P-TEFb Komplexes beschrieben (Abbildung 2.12; He et al., 2010; Jager et al., 2012; Lin et al., 2010; Sobhian et al., 2010; Yokoyama et al., 2010). Die HIV Transkription wird speziell durch das Protein AFF4 stimuliert (He et al., 2011), das ohne Tat die ELL2/P-TEFb Interaktion zwar vermitteln kann, hierbei aber ineffizienter agiert. Tat stellt somit einen Teil des Superelongationskomplexes dar (Chou et al., 2013; He et al., 2011).

2.5.4 Der Superelongationskomplex: Einfluss von AFF4 auf die Transkription

Die Chromosomentranslokationen in MLL-Genen (engl.: *mixed lineage leukemia*) können zu Proteinchimären führen, die mit akuter lymphoblastischer Leukämie verbunden sind. Es gibt eine große Zahl von Translokationspartnern von MLL, deren Translokation zur Entstehung von Leukämie führen. Der Proteinkomplex SEC, der das MLL Fusionsprotein enthält, aktiviert unter anderem die Kinase P-TEFb (Abbildung 2.12; He et al., 2010; Sobhian et al., 2010). Der Superelongationskomplex SEC besteht aus den Proteinen AFF1 oder AFF4, AF9/ENL, ELL1/2/3 und EAF1/2 und vielen anderen Faktoren (Biswas et al., 2011; Byun et al., 2012; Estable et al., 2002; Lin et al., 2010; Luo et al., 2012). Die Bildung dieser Superelongationskomplexe stimulieren die Transkription von regulativen HOX Genen, deren Genprodukte Transkriptionsfaktoren sind (Mueller et al., 2007; Mueller et al., 2009). AFF4 entwickelte sich zunehmend zum zentralen Gerüst des SECs, das andere Faktoren durch direkte Interaktionen mit kurzen hydrophoben Regionen entlang seiner strukturell ungeordneten Achse rekrutiert (Chou et al., 2013). Dieses Gerüst ist für den Zusammenhalt und die Stabilität des Komplexes verantwortlich (Lin et al., 2010). Da ein Knockdown von AFF4 in leukämischen Zellen zur einer Reduktion der Expression von MLL Genen führt, könnte hier eine Schlüsselregulation in der Entstehung von Leukämie liegen (Lin et al., 2010). AFF4 wurde ursprünglich als Fusionspartner von MLL-Genen in Säuglingen mit akuter lymphoblastischer Leukämie identifiziert. AFF4 ist ein flexibles, ungeordnetes, zentrales Interaktionsprotein mit zwei verschiedenen Bindestellen am N- und C-Terminus für CycT1, ELL2 und ENL oder AF9. Die Bindung dieser Proteine an AFF4 ist weder abhängig von der Bindung des Proteins Tat noch von der Bindung anderer Proteine. Die Proteine, die AFF4 binden, sind modular und bifunktional, beispielsweise haben ELL2, ENL und AF9 jeweils eine C-terminale Domäne, die mit AFF4 interagiert und eine N-terminale Domäne, die an PAF1 (engl.: *polymerase-associated factor complex*) bindet (Chou et al., 2013). AFF4 ist zudem für die Transkription durch die RNAP II verantwortlich, indem es an P-TEFb bindet. Es wurde gezeigt, dass der SEC Komplex die RNAP II CTD phosphorylieren kann (Lin et al., 2010) und dass Tat und AFF4 möglicherweise zur gleichen Zeit an P-TEFb binden könnten (Schulze-Gahmen et al., 2013). Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keine weiteren Analysen über das Verhalten, den Mechanismus oder die Struktur von AFF4 mit P-TEFb.

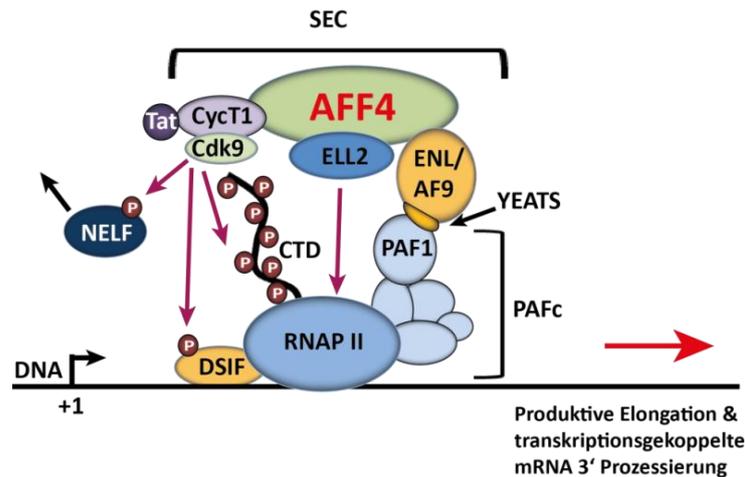


Abbildung 2.12: Der Superelongationskomplex

Rekrutierung des Superelongationskomplexes, welcher entweder ENL oder AF9 enthält und das Gerüstprotein AFF4. Die Interaktion zur RNAP II erfolgt über die ENL/AF9 YEATS Domäne und der PAF1 Untereinheit von PAFc. Diese Konfiguration ermöglicht dem Superelongationskomplex über seine Untereinheiten P-TEFb und ELL2 eine Vielzahl von Effekten, die in der synergistischen Aktivierung der RNAP II Elongation und der mRNA 3'-Prozessierung, auszuüben (He et al., 2011; Zhou et al., 2012). Das Netzwerk des P-TEFb Komplexes reguliert sowohl die zelluläre als auch die HIV Transkription.

Myc ist ebenfalls eines der direkten Zielproteine von AFF4/SEC und die Rekrutierung von SEC zu den Myc Genen reguliert dessen Expression in verschiedenen Krebszellen, eingeschlossen die myeloische oder akute Leukämie. Diese Ergebnisse legen nahe, dass AFF4/SEC ein mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung von Leukämie oder anderen Krebsarten mit einer Myc-Überexpression sein könnte (Luo et al., 2012).

2.6 c-Myc als Transkriptionsfaktor

Das Genregulatorprotein c-Myc (zellulär) stimuliert die Transkription von Genen, die das Zellwachstum steigern. Da c-Myc ursprünglich als krebsförderndes Gen identifiziert wurde, wird es als Proto-Onkogen bezeichnet. Eine Überaktivierung oder Mutation eines Proto-Onkogen verursacht sehr häufig Krebs. In normalen Zellen wirkt c-Myc im Zellkern als Signal für die Zellproliferation (Eilers and Eisenman, 2008). Eine Überexpression des Proteins kann eine Zelle dazu bringen, sich unter abnormalen Bedingungen weiter zu teilen. Die Überproduktion beruht auf einer Veränderung eines regulatorischen Elements, das auf das Gen von c-Myc einwirkt. Infolge einer Chromosomentranslokation können starke Kontrollsequenzen neben die der c-Myc kodierenden Sequenz gelangen und so eine erhöhte Herstellung von c-Myc mRNA verursachen. Aufgrund solcher Mutationen wird das überschießende Zellwachstum und die Proliferation gefördert, und somit die Krebsentstehung begünstigt (Guccione et al., 2006). Als positiv stimulierender Transkriptionselongationsfaktor konnte c-Myc in Mäusembryos identifiziert werden (Rahl et al., 2010).

Die N-terminale Domäne von c-Myc weist eine transkriptionsaktivierende Domäne auf, die zwei für die biologische Aktivität relevante, konservierte Myc-Boxen enthält (Sakamuro and Prendergast, 1999). Die C-terminale Domäne beinhaltet ein *Basic/Helix-Loop-Helix/Leucin Zipper* Motiv (b/HLH/Z), das die Oligomerisierung mit dem b/HLH/Z Motiv von Max und der Sequenz spezifischen DNA Erkennung von E-Box Motiven vermittelt (Luscher and Larsson, 1999). Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist ein Substrat für die Phosphorylierung durch MAP Kinasen und wird an Ser62 durch Erk phosphoryliert (Alvarez et al., 1991). Die NH₂-terminale Region in c-Myc vermittelt dabei die Bindung an die Kinase (Gupta and Davis, 1994). Ein weiterer Bindungspartner von c-Myc ist die CycT1 Untereinheit von P-TEFb (Eberhardy and Farnham, 2001, 2002; Kanazawa et al., 2003). Hier wurde ebenfalls eine Phosphorylierung von c-Myc durch P-TEFb festgestellt (nicht veröffentlichte Daten, Böskens 2013). Dabei konnten die Phosphorylierungsstellen von c-Myc nicht vollständig geklärt werden. Auffällig an der Aminosäuresequenz von c-Myc ist, dass es mehrere SP-Motive aufweist, was ein bekanntes Motiv für die Phosphorylierung von verschiedenen Kinasen darstellt. Die Phosphorylierung von Ser62 führt zu einer Stabilisierung von c-Myc, während die Phosphorylierung von Thr58 den c-Myc-Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg fördert (Sears et al., 2000).

2.7 Zielsetzung

Die Regulation der Transkription in Eukaryoten stellt einen streng kontrollierten Prozess dar. Eine Fehlregulation beispielsweise durch Aktivatoren führt zu schwerwiegenden Krankheitsbildern wie Herzmuskelzellhypertrophie, Krebs oder akuter Leukämie. Als zentrale Schaltstelle wird dabei die C-terminale Domäne der RNAP II von verschiedenen Kinasen phosphoryliert. Das hochvariable Muster an Phosphorylierungen in der CTD von RNAP II steht in direkter Verbindung mit den einzelnen Phasen der Transkription und der RNA-Prozessierung. Die zahlreichen Kombinationen der unterschiedlichen Modifikationen generieren dabei spezifische Markierungen an verschiedenen Stellen innerhalb der Heptadstruktur und dienen möglicherweise der Rekrutierung von regulierenden Faktoren. Ein erhöhtes Interesse liegt dabei in der RNAP II vermittelten Transkription, der Aufklärung des 'CTD-Codes' und der Feststellung, dass die Promotor-pausierende RNAP II und die Elongation die wichtigsten regulatorischen Schritte in der Genexpression sind. Spezielle Fragestellungen sind welche humane Kinase die CTD an Position 2 phosphoryliert und wie die Phosphorylierung der CTD mit anderen zellulären Mechanismen gekoppelt ist (Moore and Proudfoot, 2009; Pandit et al., 2008; Perales and Bentley, 2009). Die exakte Zuordnung der funktionellen Rollen und die Substratspezifität der jeweiligen Kinasen wurden im Detail noch nicht geklärt. Eine Bestimmung der Ser2 Kinase, die die Transkriptionstermination antreibt, konnte *in vitro* noch nicht identifiziert und bestätigt werden. Die Charakterisierung von transkriptionsregulierenden Kinasen und deren Cofaktoren stellt daher die zentrale Fragestellung dieser Arbeit dar.

Der Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb vermittelt den Übergang der RNAP II vom promotorproximalen Pausieren in die produktive Transkriptionselongation. Zahlreiche Cofaktoren regulieren diese Kinaseaktivität. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden, welche Bindungseigenschaften und welchen Einfluss unterschiedliche Domänen von den Aktivatoren Brd4 und AFF4 auf die Kinase P-TEFb nehmen und ob diese einem ähnlichen Aktivierungsmechanismus folgen wie das virale HIV-1 Tat Protein. Als negativer Regulator fungiert Hexim1, dessen Inhibitionseigenschaften auf P-TEFb im Kontext mit den Aktivatoren analysiert werden sollten. Mit biochemischen Methoden sollten Interaktionsstudien und die Veränderung der Substratspezifität von P-TEFb analysiert werden. Neben P-TEFb wurden auch andere CTD Kinasen identifiziert. Erk1, Erk2, Cdk12, Cdk13, CdkF, c-Abl, Spleißkinasen und die atypische Kinase Brd4 sollen in diesem Zusammenhang näher untersucht und beschrieben werden. Durch die Verwendung von radioaktiv-markierten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -, ESI-MS- und Antikörper-basierten Western Blot Kinase-Aktivitätsassays sollte eine eindeutige Analyse der Substratspezifität und Charakterisierung der Kinasen erfolgen. Diese analytischen Studien sollten zum weiteren Verständnis der bestehenden Studien der Transkriptionsregulation beitragen und den 'CTD-Code' weiter entschlüsseln.

c-Myc stellt ein weiteres Substrat für viele Kinasen dar und ist als Schlüsselregulator der Zellproliferation an der Entstehung von verschiedenen Krebsarten weitläufig beteiligt. Es sollte mit einem möglichst breiten Spektrum an analytischen Methoden, die durch die jeweilige Kinase phosphorylierte Aminosäure innerhalb von c-Myc identifiziert werden. Um die Funktion der Phosphorylierung von c-Myc zu verstehen, soll das Protein durch biochemische Untersuchungen dieser Phosphorylierung analysiert werden.

Die besondere Relevanz der Transkriptionskinasen in der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten macht diese zu attraktiven Zielmolekülen. Aus diesem Grund sollte versucht werden, etablierte putative Inhibitoren dieser Kinasen zu identifizieren und in Strukturmodellen zu beschreiben.

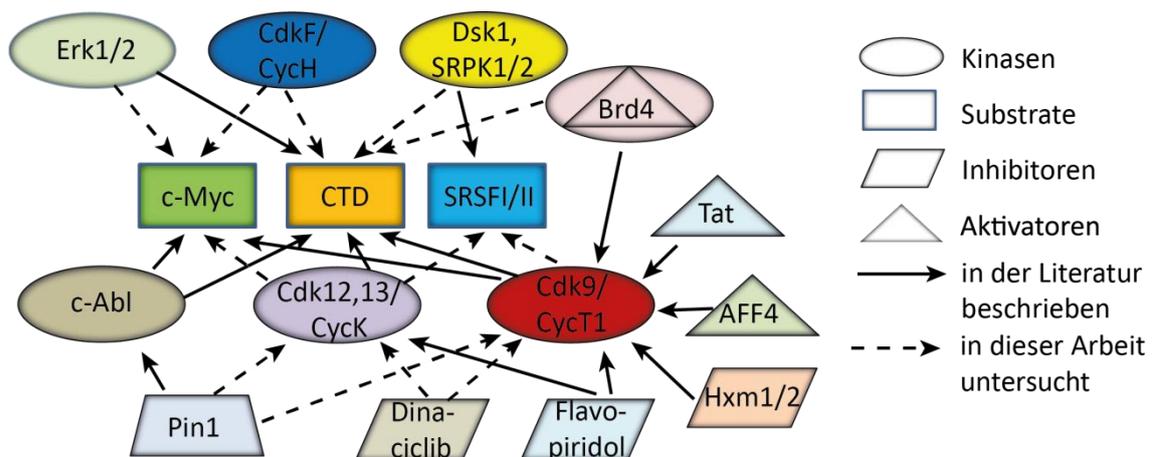


Abbildung 2.13: Übersicht und Zusammenhänge der verwendeten Proteine

Abgebildet sind die Zusammenhänge der Substrate, Kinasen und Regulatoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Feinchemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Difco Microbiology / Voigt Global, Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Fluka / Sigma-Aldrich (München, Deutschland), FMC Bioproducts (Vallensbaek Strand, Dänemark), Gerbu (Gaiberg), iNtRON Biotechnology (Sangdaewong-Dong, Südkorea), J. T. Baker / Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande), LGC Promochem (Wesel), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Roche (Basel, Schweiz), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA).

3.1.2 Nukleotide

Tabelle 3.1: Verwendete Nukleotide und Hersteller

Nukleotide	Hersteller
ATP, 100 mM Stammlösung	Jena Bioscience, Jena
ADP, AppNHp, Feststoffe	Jena Bioscience, Jena
dNTPs	Roche, Mannheim
[γ - ³² P]-ATP, 5 μ Ci/ μ L, 3000 mCi/mmol	Perkin Elmer, Boston, USA

3.1.3 Kits

Tabelle 3.2: Verwendete Kits und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Midi Kit, PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Ambion MEGAscript T7 Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
ECL Plus Western Blotting Detektions Kit	GE Healthcare, Freiburg
Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA

3.1.4 Größenstandards

Tabelle 3.3: Verwendete Größenstandards und Hersteller

Größenstandards	Hersteller
Gelfiltrationsstandard	Bio-Rad, München
LMW-Marker für SDS-PAGE	GE Healthcare, München
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Biosciences
DNA-Größenstandard 100 bp	CarlRoth, Karlsruhe
DNA-Größenstandard 1 kb	CarlRoth, Karlsruhe
See Blue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5 Sonstige Chemikalien

Tabelle 3.4: Sonstige verwendete Materialien und Hersteller

Material	Hersteller
Dialysemembranen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1 mL und 2 mL), Pipettenspitzen	Eppendorf, München
NAP-5 Säulen, PD-10 Säulen	GE Healthcare, München
Bottle Top Filter	Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark
Elektroporationsküvetten	PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen
Plastikpipetten (steril, 5 mL, 10 mL und 25 mL), Plastik-Küvetten, Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL), Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1 mL und 2 mL), Filtropur S.45, Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Whatman P81 Zellulose Optitran BA-S85 reinforced membrane	Omnilab, Bremen Whatman, Maidstone, UK
Optitran BA-S85 reinforced membrane	Whatman, Maidstone, UK

3.1.6 Mikroorganismen und Zellstämme

Tabelle 3.5-6: Verwendete Mikroorganismen und Zellstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>nupG recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 nupG λ⁻</i>
DH10 MultiBac ^{Turbo}	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL nupG /pMON14272 v-cath::Amp^r chiA::LoxP */ pMON7124</i>
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻), dcm, gal, λ(DE3)</i>
BL21 (DE3) R3-Rosetta	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻), dcm, gal, λ(DE3), pRARE</i>
XL1 Gold	TetrD(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB</i> <i>hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The [F'proAC lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr</i>
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]</i>

Zelllinie	Genotype
<i>Sf21</i>	Zelllinie basierend auf der Ursprungszelllinie IPLBSF-21 aus dem Eierstockgewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Vaughn et al., 1977)

3.1.7 DNA-Konstrukte

Tabelle 3.7: Verwendete DNA-Konstrukte und Hersteller

DNA-Konstrukte	Hersteller
Primer	MWG Biotech, München
Vektoren	pGEX-4T1 TEV-site modifiziert GE Healthcare, Freiburg
	pGEX-2T TEV-site modifiziert GE Healthcare, Freiburg
	pOPIN University of Oxford, UK
	pACEBac1, pIDC, pIDK ATG Biosynthetics, Merzhausen
	pOPINM University of Oxford, UK
	pET28a Novagen, Darmstadt

3.1.8 Enzyme

Tabelle 3.8: Verwendete Enzyme und Hersteller

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Taq Expand High Fidelity	Roche, Mannheim
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Cre Rekombinase	New England Biolabs, Ipswich, USA
TEV Protease	Caesar, Bonn
PreScission	Caesar, Bonn
PKC	ProQinase, Freiburg
Cdk7/CycH/MAT1 (0366-0360-4)	ProQinase, Freiburg
Cdk8/CycC (0376-0390-1)	ProQinase, Freiburg
CLK1 (0447-0000-1)	ProQinase, Freiburg
CLK3 (0921-0000-1)	ProQinase, Freiburg
PLK1 (0183-0000-1)	ProQinase, Freiburg
PLK3 (0183-0000-1)	ProQinase, Freiburg
p38-gamma (0958-0000-1)	ProQinase, Freiburg
p38 delta (0941-0000-1)	ProQinase, Freiburg
SRPK1 (0434-0000-1)	ProQinase, Freiburg
SRPK2 (0381-0000-1)	ProQinase, Freiburg
c-ABL wt (0992-0000-1)	ProQinase, Freiburg

3.1.9 Antikörper

Tabelle 3.9: Verwendete Antikörper und Hersteller

Antikörper	Hersteller
Anti-Rat IgG Peroxidase Antikörper sc-2964	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -pSer2 (3E10)	Prof. Dr. Dirk Eick, München
α -pSer5 (3E8)	Prof. Dr. Dirk Eick, München
α -pSer7 (4E12)	Prof. Dr. Dirk Eick, München

3.1.10 Synthetische Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma Biosyntan oder von Sascha Gentz (MPI Dortmund) nach Fmoc-Strategie mittels automatisierter Festphasensynthese hergestellt. Die Peptide wurden im Anschluss 3 h bei Raumtemperatur in 2,5 % Wasser und 5 % TIS (Triisopropylsilan) in TFA (Trifluoressigsäure, 15 mL pro 1 g Harz) vom Harz abgespalten und in eiskaltem Diethylether gefällt. Gefällte Peptide wurden in Puffer (50 % Wasser, 50 % Acetonitril (+ 0,1 % TFA)) aufgenommen und im Vakuum über Nacht gefriergetrocknet. Die Reinigung und Analytik der Peptide erfolgte an einem HPLC System über vorgepackte C18-Säulen (ProntoSIL-AQ, 5 µm) in einem linearen Gradienten von Puffer A (Wasser mit 0,1 % TFA) zu Puffer B (Acetonitril mit 0,08 % TFA).

Tabelle 3.10: Synthetische Peptide

Peptid	Sequenz	Masse/ Da	Hersteller
cons. CTD _[3]	YSPTSPS YSPTSPS YSPTSPS -PEG2-RR-amid	2633,8	Biosyntan, Berlin
pY1-CTD _[3]	PS pYSPTSPS pYSPTSPS pYSPTSPS -PEG2-RR-amid	3056,0	Biosyntan, Berlin
pY1-CTD _[3]	ac-PS pYSPTSPS pYSPTSPS pYSPTSPS-PEG2-RR-amid	3099,8	Sascha Gentz, MPI Do
pS2-CTD _[3]	S YpSPTSPS YpSPTSPS YpSPTSPS -PEG2-RR-amid	2960,8	Biosyntan, Berlin
pS2-CTD _[3]	ac-S YpSPTSPS YpSPTSPS YpSPTSPS-PEG2-RR-amid	3002,7	Sascha Gentz, MPI Do
pT4-CTD _[3]	S YSPpTSPS YSPpTSPS YSPpTSPSY -PEG2-RR-amid	3124,0	Biosyntan, Berlin
pS5-CTD _[3]	YSPTpSPS YSPTpSPS YSPTpSPS -PEG2-RR-amid	2873,8	Biosyntan, Berlin
pS7-CTD _[3]	YSPTSPpS YSPTSPpS YSPTSPpSY -PEG2-RR-amid	3037,0	Biosyntan, Berlin
pS7-CTD _[3]	ac-YSPTSPpS YSPTSPpS YSPTSPpSY -PEG2-RR-amid	3079,0	Sascha Gentz, MPI Do
K7-CTD _[3]	YSPTSPK YSPTSPK YSPTSPK -PEG2-RR-amid	2757,1	Biosyntan, Berlin
S2A-CTD _[3]	S YAPTSPS YAPTSPS YAPTSPS -PEG2-RR-amid	2672,9	Sascha Gentz, MPI Do
S5A-CTD _[3]	YSPTAPS YSPTAPS YSPTAPS -PEG2-RR-amid	2585,8	Sascha Gentz, MPI Do
S2A_pS7-CTD _[3]	YAPTSP-pS-YAPTSP-pS-YAPTSP-pS -PEG2-RR-amid	2826,0	Sascha Gentz, MPI Do

S5A_pS7-CTD _[3]	YSPTAPpS YSPTAPpS YSPTAPpS Y -PEG2-RR-amid	2989,0	Sascha Gentz, MPI Do
S5A_pS2-CTD _[3]	ac-Y-pS-PTAPS Y-pS-PTAPS Y-pS- PTAPpS -PEG2-RR-amid	2867,6	Sascha Gentz, MPI Do
S7A_pS2-CTD _[3]	ac-pS-PTSPA Y-pS-PTSPA Y-pS- PTSPA Y -PEG2-RR-amid	3030,8	Sascha Gentz, MPI Do
pS2-N-CTD _[3]	ac-YpSPTSPS YSPTSPS YSPTSPS -PEG2-RR-amid	2755,9	Sascha Gentz, MPI Do
pS2-C-CTD _[3]	ac-SYSPTSPS YSPTSPS YpSPTSPS -PEG2-RR-amid	2842,9	Sascha Gentz, MPI Do
pS5-N-CTD _[3]	YSPTpSPS YSPTSPS YSPTSPS -PEG2-RR-amid	2713,9	Biosyntan, Berlin
pS5-C-CTD _[3]	S YSPTSPS YSPTSPS YSPTpSPS -PEG2-RR-amid	2800,9	Biosyntan, Berlin
pS7-N-CTD _[3]	ac-TSPpS YSPTSPS YSPTSPS YSPT -PEG2-RR-amid	2856,7	Sascha Gentz, MPI Do
pS7-C-CTD _[3]	ac-YSPTSPS YSPTSPS YSPTSPpS YS -PEG2-RR-amid	3005,9	Sascha Gentz, MPI Do

3.1.11 Materialien für eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie

Tabelle 3.11: Materialien und Hersteller für eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie

Material	Hersteller/Zusammensetzung
<u>für Eukaryotische Zellkultur</u>	
Sf-900 TM III SFM 1x, flüssig	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin Lösung	Sigma, Steinheim
Cellfectin II	Invitrogen, Karlsruhe
<u>für Prokaryotische Zellkultur</u>	
LB Medium	1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4
TB Medium	900 mL 1,2 % (w/v) Bactotrypton, 2,4 % (w/v) Hefeextrakt, 0,04 % (v/v) Glycerin 100 mL 0,17 M KH ₂ PO ₄ ; 0,72 M K ₂ HPO ₄

2x TY Medium	1,6 % (w/v) Bactotrypton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,4
LB Differenzierungsplatten	LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin, 7 µg/mL Gentamycin, 10 µg/mL Tetracyclin, 100 µg/mL X-Gal, 40 µg/mL IPTG
Antibiotika	Ampicillin (100 mg/L Medium) Chloramphenicol (34 mg/L Medium) Kanamycin (50 mg/L Medium) Gentamycin (7 mg/L Medium) Tetracyclin (10 mg/L Medium) Streptomycin (100 µg/mL Medium)
Minimalmedium	0,5 g NaCl 1,3 mL Spurenelementelösung 1 g Zitronensäuremonohydrat 36 mg Eisencitrat 4,02 g KH ₂ PO ₄ 5,96 g K ₂ HPO ₄ 1 mL Zink-EDTA Lösung (EDTA 5 mg/mL, Zn(Ac) ₂ 8,4 mg/mL) 1 g ¹⁵ NH ₄ Cl
Spurenelemente für Minimalmedium	2,5 g/L Borsäure 2,0 g/L CoCl ₂ · 6 H ₂ O 1,1 g/L CuCl ₂ · 2 H ₂ O 9,8 g/L MnCl ₂ · 2H ₂ O 2,9 g/L Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O
Zugabe Minimalmedium nach Autoklavieren	1 M MgSO ₄ , steril filtriert 1 %ige Thiamin-Lösung, steril filtriert 20 %ige Glukose-Lösung, separate autoklaviert (für zusätzliche ¹³ C-Markierung anstatt dessen: 2-3g ¹³ C-Glukose)

3.1.12 Chromatographiematerialien

Tabelle 3.12: Chromatographiermaterialien und Hersteller

Säulen/Säulenmaterial	Hersteller
HisTrap FF	GE Healthcare, München
Ni-NTA Superflow	QIAGEN, Hilden
GSTrap FF	GE Healthcare, München
GSH 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
HiTrap SP HP	GE Healthcare, München
MBPTrap HP	GE Healthcare, München
HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare, München
Superdex 75 HR 10/30 column	GE Healthcare, München
HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare, München
Superdex 200 HR 10/30 column	GE Healthcare, München
VYDAC-C ₄ -Säule für ESI-MS	Grace, Deerfield, USA

3.1.13 Laborgeräte und Zubehör

Tabelle 3.13: Laborgeräte und Zubehör

Laborgeräte	Hersteller
Agarosegelkammer, DNA-SUB-Cell	Bio-Rad, München
Autoklav	Systec, Wetzlar
Brutschrank, Heraeus CO ₂ Auto zero	Heraeus Instruments, Hanau
Elektroporator	Eppendorf, München
Elektrospraymassenspektrometer:	
Finnigan LCQ Advantage MAX	Thermo Fisher Scientific, Corston, UK
Agilent 1100 Chromatographiesystem	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
FPLC-System Äkta Prime	GE Healthcare
Gefriergerät (-80 °C)	Thermo Scientific, Corston, UK
HPLC-Systeme:	
Waters 600 S Controller	Mildford, USA
Waters 626 Pumpe	Mildford, USA
Waters 2487 Dual Absorptionsdetektor	Mildford, USA
Waters 717 plus Autosampler	Mildford, USA
und Inline Entgaser AF	Mildford, USA

Kühlzentrifuge Eppendorf 5810R	Eppendorf, München
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Schwabach
Mikrofluidizer, Modell 100S	Microfluidics Corp., Newton, USA
Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss, Jena
MilliPure	Thermo Scientific, Corston, UK
Nanodrop DN-1000 UV-Spektrometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Optima L-80 XP Ultrazentrifuge	Beckman, Fullerton, USA
PCR Express-Gerät	Eppendorf, München
Photometer Eppendorf Biophotometer	Eppendorf, München
Schüttelinkubator Multitron	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
SDS-PAGE Gelsystem, Mini protean III	Bio-Rad, München
Elektrophoresis System	
Szintillationszähler	Beckman Coulter, Brea, USA
Thermomixer	Eppendorf, München
Tischzentrifuge Eppendorf 3424	Eppendorf, München
Trans-Blot Semi-Dry blotter Unit	Scie-Plas, Cambridge, UK
Ultraschallgerät, Branson Sonifier W-250	Branson, Danbury, USA
Optima L-80 XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Vortexer Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Bruchsal
Waage Sartorius BP110S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Avanti TM J-20 XP	Beckman, Fullerton, USA
Zentrifuge JS-HS centrifuge	Beckman, Fullerton, USA
Stopped-flow SX20	Applied Photophysics Ltd, Surrey, Großbritannien
J-815 Circular dichroismus	Jasco UK, Essex, UK
Spektropolarimeter	
iTC ₂₀₀	MicroCal / GE Healthcare, München
pH Meter	Schott Instruments, Mainz
Feinwaage CPA324S	Sartorius Weighing Technology, Göttingen
Blotauswerter	LAS-3000 intelligent Dark Box, Fujifilm, Düsseldorf
Schüttler	New Brunswick Scientific, Jersey, USA

3.1.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 3.14: Häufig verwendete Pufferzusammensetzungen

Anwendung	Puffer	Zusammensetzung
Reinigung GSTrap FF	Lysispuffer	50 mM Hepes pH 7,4-7,6; 200-500 mM NaCl; 10 % Glycerol; 5 mM β -ME
	Waschpuffer	50 mM Hepes pH 7,4-7,6; 1000 mM NaCl; 10 % Glycerol; 5 mM β -ME
	Elutionspuffer	50 mM Hepes pH 7,4- 7,6; 200-500 mM NaCl; 10 % Glycerol; 5 mM β -ME + 10 mM GSH
Reinigung MBPTrap HP	Lysispuffer	50 mM Hepes pH 7,4-7,6; 200-500 mM NaCl; 10 % Glycerol; 5 mM β -ME
	Waschpuffer	50 mM Hepes pH 7,4-7,6; 1000 mM NaCl; 10 % Glycerol; 5 mM β -ME
	Elutionspuffer	50 mM Hepes pH 7,4- 7,6; 200-500 mM NaCl; 10 % Glycerol; 5 mM β -ME + 10 mM Maltose
Reinigung HisTrap FF	Lysispuffer	50 mM HEPES pH 7,6; 100 mM NaCl; 5 mM β -Mercaptoethanol; 10 mM Imidazole
	Elutionspuffer	50 mM Hepes pH 7,6; 500 mM NaCl; 350 mM Imidazol; 5 mM β -Mercaptoethanol
	Gelfiltrationspuffer	20-50 mM Hepes pH 7,4-7,6; 100-300 mM NaCl; 5- 10 % Glycerol; 1-2 mM TCEP
Reinigung N-His ₆ -3C-c-Myc	Lysispuffer	50 mM HEPES pH 7,6; 100 mM NaCl; 5 mM β -Mercaptoethanol; 0,1 mg/mL Lysozyme
	Waschpuffer	50 mM HEPES pH 7,6; 100 mM NaCl; 2 mM β -Mercaptoethanol; 1 M Urea ; 0,5 % TritonX-100
	Extraktionspuffer	50 mM HEPES pH 7,6; 100 mM NaCl; 2 mM β -Mercaptoethanol; 8 M Urea
	Rückfaltungspuffer 1	50 mM HEPES pH 7,6; 100 mM NaCl; 2 mM β -Mercaptoethanol; 4 M Urea
	Rückfaltungspuffer 2	50 mM HEPES pH 7,6; 100 mM NaCl; 2 mM β -Mercaptoethanol ; 10 mM Imidazole
	Elutionspuffer (HisTrap)	50 mM Hepes pH 7,6; 500 mM NaCl; 350 mM Imidazol; 5 mM β -Mercaptoethanol
	Gelfiltrationspuffer	20 mM HEPES pH 7,6; 200 mM NaCl; 1 mM TCEP
DNA Präparation	TBE-Puffer (10-fach)	89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,9 mM EDTA
	DNA-Ladepuffer	10 % (w/v) Ficoll 0,025 % (w/v) Bromphenolblau oder 0,025 % (w/v) Xylenxylanol in 1x TBE-Puffer

SDS-PAGE	Färbelösung	44 % (v/v) Ethanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
	Entfärbelösung	44 % (v/v) Ethanol 12 % (v/v) Essigsäure
	Laufpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
	Probenpuffer (2-fach)	100 mM Tris pH 6.8 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol 0,2 % Bromphenolblau 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
	Probenpuffer (6x)	50% (v/v) Glycerin 0,042 % (w/v) Bromphenolblau
	Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6.8 0,4 % (w/v) SDS
	Trenngelpuffer	1.5 M Tris pH 8.8 0,4 % (w/v) SDS
Western Blot	Anoden-Blot-Puffer I	300 mM Tris/HCl 20 % (v/v) Methanol pH 10,4
	Anoden-Blot-Puffer II	25 mM Tris/HCl 20 % (v/v) Methanol pH 10,4
	Kathoden-Blot-puffer	25 mM Tris/HCl 40 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 9,4
	TBS- Puffer	50 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,4
	TBST- Puffer	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20 pH 7,4
	PBS- Puffer	150 mM NaCl 25 mM Natriumphosphat 2 mM EDTA pH 8
	PBST- Puffer	150 mM NaCl 25 mM Natriumphosphat 2 mM EDTA 0,1 % (v/v) Tween 20 pH 8

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Elektrokompente Zellen

Zunächst wird eine Übernacht-Vorkultur der Zellen angesetzt. Hierzu werden für Top10 Zellen Streptomycin (10 mg/L) zur Kultur gegeben und bei 37 °C ü.N. inkubiert. Die Hauptkultur wird mit der Vorkultur auf eine OD von 0,05 angeimpft und ebenfalls mit Tetracyclin versetzt. Die Kultur wird bis zur Hälfte der exponentiellen Phase wachsen gelassen. Anschließend erfolgt die Ernte der Zellen bei einem Zentrifugationsschritt bei 6000 rpm für 20 min und der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden mehrmals mit 5 % eiskaltem Glycerin gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 mL 5 % Glycerin aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen werden in 10 % Glycerin aufgenommen und resuspendiert, dabei ist die Menge Glycerin an die OD bei 600 nm anzupassen. Die OD_{600nm} sollte zwischen 120-160 OD₆₀₀ liegen. Die Zellsuspension wurde letztlich in 80 µL Aliquots abgefüllt und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation von Nukleinsäuren in kurzer Zeit zur weiteren Analyse. In einem drei-Zyklus-Verfahren wird im ersten Schritt die doppelsträngige DNA durch Erhitzen voneinander getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt (Annealing) werden die Proben bis zum Schmelzpunkt der Primer-Matrix-Hybride abgekühlt, damit die Primer an den zu amplifizierenden Einzelstrang anlagern können. Im letzten Schritt (Extension/elongation) werden die Primer mit Hilfe einer Polymerase bei 72 °C vom 3'-Ende komplementär aufgefüllt, indem sie freie Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTP's) entsprechend der Matrize an das unmodifizierte 3'-Ende des Oligonukleotids binden. Typischerweise durchliefen PCR Ansätze in dieser Arbeit 25-35 Zyklen und setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 3.15: Zusammensetzung der PCR Ansätze

Komponenten	Mengen
dsDNA template	25 ng
Primer (forward)	1 µM
Primer (reverse)	1 µM
dNTPs	200 µM
10x Polymerase Puffer	5 µL
Exp. High Fid. DNA-Polymerase	0,02 U/µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

DNA-Fragmente wurden unter Verwendung eines PCR-Geräts (Eppendorf, München) nach folgendem PCR-Programm amplifiziert:

Tabelle 3.16: PCR Zyklus Parameter

Denaturierung	95 °C	2 min	} 25-35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 s	
Annealing	50-65 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min/ 1000 bp	
Finale Elongation	72 °C	8 min	

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, das auf der Wanderung von negativ geladenen DNA-Molekülen beruht. In einem elektrischen Feld bewegen sich die DNA-Moleküle entsprechend ihrer Ladung, Größe und Form, wodurch man die Moleküle auftrennen kann.

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,7 %- 2 %ige (w/v) Tris-Borat-(TBE-) Agarosegele hergestellt. Zur Analyse wurden die entsprechenden Proben in DNA-Probenpuffer aufgenommen und in die Taschen geladen. Eine Auftrennung der DNA erfolgte anschließend bei einer Spannung von etwa 120 V. Als DNA Marker diente der auch zur Quantifizierung geeignete MassRuler (10 kb bis 80 bp) der Firma Thermo Scientific. Die Visualisierung der DNA in Agarosegelen erfolgte entweder mit Ethidiumbromid, einem interkalierendem Farbstoff, der bei Bestrahlung mit UV-Licht längerwellig absorbiert oder mit der Midori Green (Biozym Scientific, Wien, A), GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA), RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Sangdaewong-Dong, Südkorea). Diese Farbstoffe wurden direkt zum Gel gegeben und sollen nicht in genomische DNA interkalieren.

3.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, welche in der Lage sind, die Phosphodiesterbindungen der DNA-Stränge hydrolytisch zu spalten. Ihre biologische Funktion liegt darin, fremde DNA-Moleküle in der Zelle zu zerstören. Die Restriktionsenzyme unterscheiden sich in ihrer Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. Durch die Spaltung des DNA-Stranges können klebrige Enden (engl.: *sticky-ends*) oder glatte Enden (engl.: *blunt ends*) entstehen. Diese können durch Ligation wieder miteinander verknüpft werden. Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte durch Inkubation bei 37 °C mit dem entsprechenden Restriktionsenzym für 10 min bis 2 h.

3.2.5 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Bakteriophage T4-DNA-Ligase. Zur Herstellung eines Expressionsvektors wurden 50 ng linearisierter Vektor mit einem 5-fach molaren Überschuss des gewünschten DNA-Fragments bei RT für 10 min bis 3 h ligiert.

3.2.6 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen erfolgte mittels Elektroporation oder Hitzeschocktransformation, einem molekularbiologischen Verfahren, mit dem man DNA in Zellen einbringen kann. Dabei werden die Zellmembranen der Empfängerzellen durch kurze elektrische Pulse oder Hitze für Makromoleküle durchlässig gemacht. Es wurden 50-100 ng Plasmid DNA bzw. 2-10 µL Ligationsansatz mit 60 µL kompetenter Zellen in einer 10 %igen enthaltenen Glycerinsuspension vermischt. Bei der Hitzeschocktransformation wurden die Zellen 45 s auf 42 °C erhitzt und im Anschluss eine Minute auf Eis inkubiert. Bei der Elektroporation wurden die Zellen in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgte mittels eines Eporators (Eppendorf, München) durch einen Spannungspuls von 1,5 kV. Die transformierten Zellen wurden in 1 mL LB-Medium aufgenommen, 1 h bei 37 °C geschüttelt, auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep oder Plasmid Midi Kits (QIAGEN) entsprechend der Anleitung des Herstellers.

3.2.7 DNA-Sequenzierung

Nach erfolgreicher Restriktionskontrolle einzelner Klone wurden positive Klone zur Überprüfung korrekter Ligationen sowie eingeführter Mutationen in DNA-Plasmiden sequenziert. Die DNA-Sequenzierung erfolgt mit Hilfe der Kettenabbruch-Synthese, die auch Sanger-Methode genannt wird (Sanger, 1975; Sanger et al., 1977). Die Sequenzierung wurde in der zentralen Einheit für Biotechnologie (MPI Dortmund) oder von GATC Biotech AG (Konstanz) analysiert.

3.2.8 *In vitro* Synthese von RNAs

In dieser Arbeit verwendete RNAs wurden mit Hilfe von Frau Karin Vogel-Bachmayr unter Verwendung des Ambion MEGAscript T7-Kits (Applied Biosystems) transkribiert. Die Herstellung und Reinigung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.9 Herstellung von Multigen-Expressionskassetten per Cre-loxP-Reaktion

Im Gegensatz zu Prokaryoten vermittelt die Expression in Insektenzellen authentische posttranslationale Modifikation von eukaryotischen Proteinen (Murphy and Piwnicka-Worms, 2001; Murphy et al., 2004). Das baculovirale Multigen-Expressionssystem MultiBac^{Turbo} (ATG:Biosynthetics) bietet dabei die Möglichkeit mehrere Gene in einem einzelnen Virus zu platzieren und erlaubt so die bestmögliche Produktion von Proteinkomplexen (Bieniossek et al., 2012). Den Kern dieser Technologie bilden speziell entworfene Transfervektoren, die als Akzeptor- (pACEBac1 und pACEBac2) und Donorvektoren (pIDK, pIDC und pIDS) bezeichnet werden. Im Anschluss an die Klonierung der Untereinheiten eines Proteinkomplexes in die Transfervektoren gilt es, diese in einem nächsten Schritt miteinander zu fusionieren. Sowohl Akzeptor- als auch Donorvektoren enthalten einzelne loxP-Stellen und können mittels *in vitro* Cre-Rekombination fusioniert werden. Die Cre-Rekombinase ist ein Mitglied der Integrase-Familie des Bakteriophagen P1 und kann DNA-Stränge mit loxP-Stellen an entsprechender Stelle schneiden und wieder miteinander verbinden (Abremski and Hoess, 1984; Abremski et al., 1983; Metzger and Feil, 1999). Während der Cre-Rekombination stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem einzelne Vektoren und alle möglichen Kombinationen gleichzeitig existieren können. Donor-Vektoren enthalten daher einen konditionalen R6K γ -Replikationsursprung, dessen Replikation von einem *pir*-Gen abhängig ist. Die Transformation der Cre-Reaktion in *pir*-negative Stämme und die Inkubation auf Agarplatten mit den Vektorbausteinen entsprechenden Antibiotikakombinationen selektiert die gewünschten Fusionsvektoren.

In einer 20 μ L Cre-Reaktion wurden Akzeptor- und Donor-Vektoren in einem molaren Verhältnis von 3:1 zu einer Gesamtmenge von 2 μ g DNA mit 2 μ L 10x Cre-Puffer und 2U Cre-Rekombinase (New England Biolabs) gemischt. Das Gesamtvolumen wurde mit ddH₂O auf 20 μ L gebracht und die Reaktion für 30-60 min bei 30 °C inkubiert. 1 μ L des Reaktionsansatzes wurde in 50 μ L elektrokompetente *E. coli* Top10 transformiert (Abschnitt 3.2.6), 1 mL 2xLB Medium hinzugefügt und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf LB-Agar-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C. Die korrekte Zusammensetzung der Fusionsvektoren einzelner Klone wurde mittels Restriktionsverdau (Abschnitt 3.2.4) bestätigt und die Plasmid-DNA von positiven Klonen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.2.10 Transposition des Transfervektors in das baculo-virale Genom

Das MultiBac^{Turbo} baculo-virale Genom wird in *E. coli* DH10-Zellen in Form eines BAC (engl.: *bacterial artificial chromosome*) aufrechterhalten. Es enthält eine Erkennungssequenz für die bakterielle Transposase Tn7 (mini-attTn7) im N-terminus eines

lacZ α -Gens. Die Tn7-Transposase wird gleichzeitig in *trans* von einem Helfer-Plasmid (pMON7124) zur Verfügung gestellt. Tn7-Transpositionssequenzen im Akzeptorvektor erlauben die Integration des Fusionsvektors in das Virusgenom durch die Transposition des mini-attTn7-Elements aus dem Fusionsvektor in die mini-attTn7 Erkennungssequenz des Bacmids. Die Insertion stört die Expression des *lacZ α* -Peptids, infolgedessen weiße Kolonien mit rekombinantem Bacmid in Gegenwart von X-Gal und induzierendem IPTG von blauen Kolonien mit unverändertem Bacmid unterschieden werden können. Dieses Prinzip basiert auf dem Bac-to-Bac-System (Invitrogen), wobei jedoch die nachträgliche Elimination von spezifischen Genen (*V-cath*, *chiA*) aus dem Virus bei MultiBac^{Turbo} zu einer verbesserten Proteinproduktion führen (Berger et al., 2004).

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Transformation und Transposition

Nach der Erstellung rekombinanter pFastBac-Plasmide (Abschnitt 3.2.9) und ihrer Überprüfung auf Vollständigkeit und Sequenzidentität, konnte die DNA in DH10MultiBac^{Turbo}-Zellen transformiert werden, um eine Transposition in das Bacmid zu ermöglichen. Hierzu wurden etwa 1 ng des rekombinanten Plasmids mit einem auf Eis aufgetauten Aliquot an DH10MultiBac^{Turbo}-Zellen vermischt. Nach Elektroporation oder Hitzeschock (Abschnitt 3.2.6) wurde 1 mL LB Medium hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde für 4 h bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt und anschließend auf Differenzierungsagarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubationsphase von 48 h bei 37 °C wurden weiße Kolonien isoliert und zur Kontrolle erneut ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Zur Präparation der Bacmid-DNA wurden einzelne weiße Kolonien über Nacht in 2 mL LB Flüssigmedium mit Ampicillin (100 µg/mL), Kanamycin (50 µg/mL), Gentamycin (7 µg/mL) und Tetracyclin (10 µg/mL) bei 37 °C und 150 rpm angereichert.

3.3.2 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA

Für die initiale Virusproduktion V_0 wurde die rekombinante Bacmid-DNA aus DH10MultiBac^{Turbo}-Zellen isoliert und für die Transfektion von *Sf21* oder *Sf9*-Insektenzellen verwendet. Die Isolation und Präparation der Bacmid-DNA erfolgte nach Anzucht mittels alkalischer Lyse der Zellen, gefolgt von Präzipitation der DNA. Die alkalische Lyse wurde mit den QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) Lösungen P1, P2, P3 entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Der Überstand wurde mit 800 µL Isopropanol präzipitiert und das DNA-Pellet zweimal mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA wurde das gereinigte Bacmid in 20 µL sterilem ddH₂O resuspendiert.

3.3.3 Kultivierung von Sf21 Zellen

Sf21 und Sf9 sind kontinuierliche Zelllinien, die ursprünglich aus der Ursprungszelllinie IPLBSF-21 aus den Eierstöcken der Mottenart *Spodoptera frugiperda* isoliert wurde. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in Sf-900TM III SFM 1x Insektenzellflüssigmedium mit 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung oder gegebenenfalls auch ohne Antibiotikum. Zum Anwachsen wurden die Zellen adhärent in Petrischalen kultiviert, bei größeren Mengen als Suspensionskulturen in Erlenmeyer oder Fernbachkolben bei 27 °C. Die Zellen wurden regelmäßig mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und kontinuierlich innerhalb einer Dichte von 0,3 bis 2×10^6 Zellen/mL gehalten.

3.3.4 Transfektion von Sf21 Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA

Unter dem Begriff der Transfektion versteht man die Aufnahme von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Durch die Aufnahme der DNA wird diese daraufhin von den Zellen vermehrt und die eingeschleusten Gene exprimiert. Für die Transfektion von Sf21 Zellen mit Bacmid-DNA wurden 1×10^6 Zellen in 2 mL Medium in einer 6-Loch-Platte ausgesät und zum Anwachsen für eine Stunde bei 27 °C inkubiert. Pro Ansatz wurden 6 µL Cellfectin und 5 µL Bacmid-DNA mit jeweils 100 µL Medium verdünnt und anschließend in insgesamt 1 mL Medium vereint. Nach 45 min Inkubationszeit wurden die Ansätze auf die zuvor gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 4-6 h bei 27 °C inkubiert, anschließend wurde der Überstand entfernt und 2 mL frisches Medium hinzugefügt. Der virushaltige Überstand (V_0) konnte nach 72 h geerntet, durch Zentrifugation geklärt (5 min, 2.000 g) und bei 4 °C in Dunkelheit in 15 mL Röhrchen gelagert werden.

3.3.5 Virusamplifikation

2,5 mL des initialen Virus V_0 wurden verwendet um 50 mL Sf21 oder Sf9-Suspensionskulturen mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL zu infizieren. Die Suspensionskulturen wurden bei 27 °C und 80-100 rpm inkubiert. Die Zellen wurden täglich auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL subkultiviert. 3-7 Tage nach Infektionsbeginn fand der Zellteilungsstopp statt und die Zellen wurden für weitere 48 h inkubiert. Der Virusüberstand (V_1) wurde per Zentrifugation bei 2.000 g geerntet und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Für die Virusproduktion im großen Maßstab wurden 200 mL Zellen mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL mit 2,5 mL des Virusüberstands V_1 infiziert. Die Zellen wurden geteilt bis die Zellproliferation sich einstellte, um anschließend für weitere 48 h zu inkubieren. Der Virusüberstand (V_2) wurde geerntet und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinexpression in *E. coli*

Biochemische und biophysikalische Untersuchungen an Proteinen verlangen häufig deren Verfügbarkeit in größeren Mengen bei zugleich höchstmöglicher Reinheit. Zur Expression rekombinanter Proteine wurden Transformanten des Stammes BL21 (DE3) eingesetzt, die auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Für die Vorkultur wurden 50-250 mL steriles LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Kolonie bei 37 °C über Nacht herangezogen. Es wurden 3-5 L antibiotikahaltiges LB Medium auf eine optische Dichte $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1 mit der Vorkultur angeimpft und bis zur exponentiellen Phase der Zellen ($OD_{600\text{ nm}}$ 0,5-0,8) bei 37 °C wachsen gelassen. Bei einer Extinktion von 0,5-0,8 wurde die Expression durch Zugabe von 0,1-0,5 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte normalerweise nach 3 h bei 30 °C oder bei 20 °C über Nacht durch Zentrifugation bei 4500 g für 15 min. Das Pellet wurde mit Zellwaschpuffer (PBS) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder nach Resuspension in Lysepuffer weiterverarbeitet.

3.4.2 Proteinexpression in *Sf21* oder *Sf9*-Insektenzellen

Für die Proteinexpression wurden *Sf21*-Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/mL verwendet. Zellen wurden mit 2-4 % Virus V_2 entsprechend einer MOI (engl.: *multiplicity of infection*) von mindestens 1 (Bernard et al., 2001; Bieniossek et al., 2008) infiziert und für 3 bis 4 Tage bei 27 °C und 80 rpm in einem Schüttler der Firma Infors HAT Multitron (Einsbach) inkubiert. Zur Zellernte wurden die Zellen bei 1000 g für 20 min zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde entweder bis zur späteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder nach Resuspension in Lysepuffer direkt weiterverarbeitet.

3.4.3 Isotopenmarkierte Proteinexpression in *E. coli*

Zur isotopenmarkierten Expression in *E. coli* wurde ein Minimalmedium verwendet. Vor der Expression wird pro Liter Medium 1 mL steril filtrierte 1 M $MgSO_4$, 560 μ L steril filtrierte 1 %ige Thiamin-Lösung, entsprechendes Antibiotikum, 1 g $[^{15}N]$ -Ammoniumchlorid und/oder wahlweise 3 g $[^{13}C]$ -D-Glucose und zugegeben. Weiter verfährt man wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

3.4.4 Zellaufschluss

Die in 50-100 mL Lysepuffer mit 1 mM PMSF (Phenylmethylylsulfonylfluorid) resuspendierten Zellen wurden in einem Microfluidizer (Microfluidics International Corporation, Newton, USA) oder mittels Ultraschall aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 15.000xg oder 45.000xg für 45 min bis 60 min bei 4 °C und anschließender Filtration werden die Zellmembranen und andere unlösliche Bestandteile sedimentiert und die erhaltene Cytoplasmafraktion geklärt.

3.4.5 Rückfaltung von Proteinen

Die Expression der rekombinanten Proteine kann in *E. coli* zur Bildung von Einschlusskörpern (engl.: *inclusion bodies*) führen. Einschlusskörper stellen unlösliche Aggregate des rekombinant exprimierten Proteins dar. Diese unlöslichen Proteine müssen denaturiert und anschließend wieder zurückgefaltet werden. Nach erfolgtem Zellaufschluss wird das Protein durch mehrere Waschschrte von anderen Membrankomponenten und Verunreinigungen abgetrennt. Der im Wasch- und Extraktionspuffer enthaltene Harnstoff dient dabei als Denaturierungsmittel der Proteine. Die Rückfaltung der Proteine erfolgte durch einen Pufferaustausch.

3.4.6 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, das der Aufreinigung bzw. Trennung von Nukleotiden, Nukleinsäuren und Proteinen aus einer Lösung dient. Dabei bindet das Zielmolekül nicht kovalent an einen immobilisierenden Liganden. Dieser Ligand wechselwirkt wiederum mit der stationären Phase der Chromatographiesäule. Alle nicht an den Liganden bindenden Bestandteile der Lösung werden während des Beladungsvorgangs abgetrennt. Durch eine kompetitive Verdrängung, einen Konformationswechsel, eine Änderung des pH-Werts oder einer Änderung der Ionenstärke ist es möglich, das Zielprotein von der Säule zu eluieren. Rekombinante Proteine wurden für typischerweise mit einem Glutathione-S-Transferase- (GST-) Affinitätsanker, einem Maltose-Bindeprotein oder mit einem Polyhistidinanker generiert. Zwischen Zielprotein und Affinitätsanker wurde zumeist eine TEV- (engl.: *tobacco etch virus*) oder eine PreScission- (3C) Schnittstelle eingefügt. Nach dem ersten Reinigungsschritt per Affinitätschromatographie wurde der Affinitätsanker meist durch proteolytischen Verdau abgeschnitten.

Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das zugrunde liegende Prinzip der IMAC basiert auf der Fähigkeit von Histidin, als Elektronendonator an der Oberfläche von Proteinen reversibel an Übergangsmetall-Ionen zu

binden. Dazu wurde eine Agarose-Matrix, auf der Nickel-Ionen durch Chelatisierung mittels Nitrilotriacetatgruppen (NTA) gebunden sind, verwendet. Nickel bildet bevorzugt oktaedrische Komplexe aus. Da zwei Koordinationsstellen im Ni^{2+} -Ion frei sind, bindet der Histidin-Rest als Chelatkomplex. Zur Präparation von Proteinen mit einem Histidin-Rest wurde der proteinhaltige Überstand auf eine mit Äquilibrierungs-Puffer äquilibrierte HisTrap FF Säule (QIAGEN) aufgetragen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde die Matrix mit dem 20-fachen Säulenvolumen an Waschpuffer gespült. Die fraktionierte Elution erfolgte mit einem 3-fachen Säulenvolumen an Elutionspuffer. Dabei wird der Chelatkomplex kompetitiv durch die steigenden Konzentrationen an Imidazol im Wasch- und Elutionspuffer gelöst. Das Imidazol konkurriert mit dem Histidin-Rest um die Besetzungsstellen und verdrängt das Protein langsam von der Säule. Die verschiedenen Fraktionen werden gesammelt und gelelektrophoretisch analysiert.

GST-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins erfolgte mittels einer Glutathion-Sepharosesäule. Glutathion-S-Transferasen weisen eine hohe Affinität für Glutathion auf, dadurch besteht die Möglichkeit ein mit einem GST-tag fusioniertes Protein über die Bindung an eine Glutathion haltige Säulenmatrix affinitätschromatographisch aufzureinigen. Die gefilterte Proteinlösung wurde bei einer Flussrate von 2 mL/min auf eine zuvor mit Lysepuffer äquilibrierte GSTrap FF Säule (QIAGEN) aufgetragen. Der Waschvorgang wurde mit Waschpuffer und Lysepuffer durchgeführt, wodurch der erhöhte Salzgehalt von 1 M NaCl im Waschpuffer unspezifische Bindungen von Proteinen an die Matrix verhinderte. Die Elution von der Matrix erfolgte durch kompetitive Verdrängung mit einer Glutathionlösung. Die jeweiligen Fraktionen wurden gesammelt und die Reinheit über SDS-PAGE bestimmt. Die geeigneten Fraktionen wurden vereint und anschließend ankonzentriert.

3.4.7 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf der reversiblen Interaktion von geladenen Proteinen mit einer gegensätzlich geladenen stationären Phase und dient meist der Reinigung von Proteinen mit einem hohen oder niedrigen isoelektrischen Punkt. Um die Bindung an HiTrap SP HP Säulen (GE Healthcare) zu gewährleisten, wurden die Proteine zunächst in Niedrigsalz-Puffer verdünnt. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 5 mL/min auf eine HiTrap SP HP Säule geladen und die Säule danach mit Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden in einem Gradienten von 20 Säulenvolumen zu einem entsprechenden Hochsalz-Puffer (mit 1 M NaCl) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

3.4.8 Konzentrierung von Proteinproben

Nach der affinitätschromatographischen Reinigung wurden die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, mittels Ultrafiltration konzentriert. Dazu wurden Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore (Schwalbach) verwendet, die vor Gebrauch mit einer 5 %igen Lösung PEG 3000 über Nacht blockiert, mit ddH₂O gewaschen und in dem jeweiligen Lysispuffer äquilibriert wurden. Diese sind mit einer Membran mit einer definierten Porengröße ausgestattet. Durch Zentrifugation (2.500xg, 4 °C) wurde erreicht, dass Moleküle, die kleiner als die Poren sind, im Filtrat gesammelt und entfernt werden können. Dabei nimmt das Volumen der Pufferlösung ab und das im Puffer befindliche Protein, das aufgrund seiner Größe die Membran nicht passieren kann, wurde auf diese Weise ankonzentriert. Das Volumen der vereinigten Fraktionen konnte auf diese Weise auf etwa 1-5 mL verringert werden.

3.4.9 Dialyse von Proteinproben

Zur Umpufferung von Proteinlösungen wurden diese bei 4 °C über Nacht gegen wenigstens 50 Volumen des gewünschten Puffers dialysiert. Hierzu wurden Spectra/Por® Dialysemembranen verwendet, welche vor Verwendung mit ddH₂O erhitzt und gewaschen wurden. Nach Befüllen mit der Proteinlösung wurde die Dialysemembran an beiden Enden mit Dialyseschlauchklammern verschlossen. Zur Dialyse kleiner Volumina wurden Eppendorfgefäße mit einem Loch im Deckel präpariert, wobei zwischen Deckel und Gefäß die Dialysemembran befestigt war.

3.4.10 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden entweder mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) durch UV-Absorptionsspektroskopie, oder über ein Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt.

Bei der Bradford Methode wird die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G 250 an Seitenketten der Proteine und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm genutzt. Es erfolgt eine Bestimmung der Absorption bei 600 nm und über den Vergleich mit einer Eichgerade für Rinderserumalbumin (BSA) wurde die Konzentration der Proteinlösungen abgeschätzt.

Alternativ erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration über UV-Spektroskopie. Proteine zeigen eine starke Absorption im Bereich von 250-300 nm. Die Ursachen dafür sind die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, sowie die Disulfidbrücken der Cysteine. Aufgrund dieser Eigenschaft lässt sich mit Hilfe von Absorptionsspektroskopie die Konzentration von Proteinen bestimmen. Dazu wird das Lambert-Beer'sche Gesetz angewandt. Die unterschiedliche Intensität eines

jeden Proteins wird durch den molaren Absorptionskoeffizienten ϵ im Lambert-Beer'schen-Gesetz ausgedrückt. Dieser berechnet sich bei einer Absorption von 280 nm wie folgt:

Formel 3.1: Berechnung des Extinktionskoeffizienten

$$\epsilon_{280} = 5500 \cdot n_{\text{Trp}} + 1490 \cdot n_{\text{Tyr}} + 125 \cdot n_{\text{SS}} \text{ [L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{]}$$

Der Extinktionskoeffizient für das jeweilige Protein wurde mittels ProtParam berechnet. Mit Hilfe des aus der Gleichung ermittelten Extinktionskoeffizienten und der gemessenen Absorption lässt sich die Konzentration des Proteins berechnen.

Formel 3.2: Konzentrationsbestimmung nach Lambert-Beer

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \text{ [mol/L]}$$

A = gemessene Absorption, d = Durchmesser der Küvetten (auf 1 cm genormt)

$$m = c \cdot M \text{ [g/L]}$$

3.4.11 Präparative Größenausschlusschromatographie

Nach der Affinitätschromatographie erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt der Proteine mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie, bei der Moleküle anhand ihrer Größe und Form voneinander getrennt werden. Gelfiltrationsmaterialien wirken wie ein Molekularsieb und lassen sich optimal für die Abtrennung von Verunreinigungen in einem bestimmten Größenbereich einsetzen. Die Trennsäulen sind mit kleinen Kügelchen eines porösen hochvernetzten Materials (Sephacryl) gefüllt. Die Kügelchen dieses „Gels“ besitzen eine hochporöse Oberfläche, durch die die Proteine in Abhängigkeit vom Molekulargewicht, aber auch ihrer dreidimensionalen Form, durch die Kügelchen diffundieren. Kleine Moleküle diffundieren in die Poren des Gels und verbleiben dort bis sie wieder heraus diffundieren. Größeren Molekülen steht weniger zugängliches Porenvolumen zur Verfügung. Damit eluieren die großen Moleküle zuerst, gefolgt von immer kleineren. Als Säule wurde eine Highload Superdex 200 16/60 Säule oder eine Highload Superdex 75 16/60 von GE Healthcare verwendet. Bei der Gelfiltration wurde die Proteinlösung je nach Volumen über einen 500 μL bis 5 mL-Loop auf die zuvor mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Säule injiziert. Die Flussrate betrug 0,2- 1 mL/min. Die Proteine wurden bei einer Absorption von 280 nm detektiert, fraktioniert gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und wie unter Abschnitt 3.4.8 beschrieben ankonzentriert.

3.4.12 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE verbindet die Methode der Gelfiltration und der Elektrophorese. Hierbei werden Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihren relativen Molekülmassen aufgetrennt. Dies ist möglich, da die Proteine vor der Elektrophorese mit

Natriumdodecylsulfat denaturiert und die Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbunden werden. Das SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, kehrt diese nach außen und löst somit die Tertiärstruktur auf. Durch die Bindung von SDS an die Proteine sind die Proteine stark negativ geladen und das Ladungs/Masse Verhältnis ist für alle Proteine annähernd gleich. Daher ist es möglich die Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse aufzutrennen und gleichzeitig die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte nachzuvollziehen. Je nach Fragmentgröße wurden im Trenngel eine Acrylamidkonzentration von 12 % bis 18 % Acrylamidgele und im Sammelgel von 6 % bei einem Quervernetzungsgrad von 3 % bzw. 0,8 % genutzt.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung von SDS-PAGE Gelen für insgesamt 4 Gele

Lösung	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Trenngel 18 %	Sammelgel 6 %
ddH ₂ O	6,8 mL	4,8 mL	2,8 mL	2,7 mL
30 % (w/v) Acrylamid	8 mL	10 mL	12 mL	1,0 mL
Trenngelpuffer	5 mL	5 mL	5 mL	–
Sammelgelpuffer	–	–	–	1,25 mL
10 % (w/v) SDS	200 µL	200 µL	200 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	2,5 µL
10 % (w/v) APS	100 µL	100 µL	100 µL	25 µL

Nach der elektrophoretischen Trennung bei 40 mA wird das Gel mit Coomassie-Brillant-Blue-Färbelösung gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt.

3.4.13 Western Blot

Der Western Blot besteht aus mehreren Schritten, beginnend mit dem Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine Membran mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Zu den auf der Membran immobilisierten Proteinen wird dann eine Lösung mit Antikörpern gegeben, die spezifisch an das gewünschte Protein binden, aber nicht an die anderen Proteine auf der Membran. Nun wird ein weiterer Antikörper hinzugegeben, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert (hier Alkalische Phosphatase), das ein Substrat (hier BCIP/NBT) in ein farbiges Präzipitat umwandelt. So ist sichergestellt, dass die Farbentwicklung nur lokal dort erscheint, wo sich das gesuchte Protein befindet.

Das Prinzip des Western Blots ermöglicht die Auftrennung und anschließende Analyse von Proteingemischen. Hierfür werden die Proteine zunächst über ein Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt, anschließend durch den Blotvorgang auf eine Membran übertragen, auf der eine Proteindetektion mit Antikörpern erfolgen kann.

Beim Blotten wurde das Prinzip der Halbtrockenkammer verwendet und erfolgte unter Verwendung einer Trans-Blot Semi-Dry Blotter Unit Transfer Zelle (Scie/Plas) entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierfür wurde eine Optitran BA-S85 Reinforced Nitrocellulose-Membranen (Whatman) genutzt. Das Prinzip beruht auf dem Anlegen eines elektrischen Feldes, so dass die Proteine von negativen Gelkomponenten zum positiven Pol wandern. Beim Zusammensetzen der Komponenten wurde dabei darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und SDS-Gel befanden. Der Proteinübertrag erfolgte dann bei einer Spannung von 140 mA pro Blot innerhalb einer Blotting-Dauer von 40 min.

Anschließend wurden die Membranen mit Verdünnungen von 1:5 für die Antikörper 3E10, 3E8 und 4E12 der phosphorylierungsspezifischen Ratte-IgG Erstantikörper im Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden danach dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Anti-Ratte IgG Zweitantikörper (Santa Cruz) bei einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für 10 min mit PBS erfolgte die Visualisierung über Chemilumineszenz mit dem ECL Plus Detektionskit (GE Healthcare) in einem VersaDoc 4000-System (Bio-Rad) entsprechend den Angaben des Herstellers. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran nach dem Blotten mindestens 1 h in 5 % Milch/TBST oder für den Phosphorylierungsnachweis in 5 % BSA/TBST zum Absättigen der unspezifischen Bindungen geblockt. Bei Verwendung von phospho-Antikörpern wird mit BSA geblockt, da in der Milch bereits Phosphoproteine enthalten sind und durch Bindung dieser an den Antikörper ein starkes Hintergrundsignal entstehen würde. Im Anschluss an das Blocken erfolgte 1 h Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper. Die Membran wurde danach dreimal für jeweils 5 min mit PBS oder TBST gewaschen und anschließend mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Entwicklung

Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBS oder TBST gewaschen. Für die Detektion der gebundenen Antikörper wurde das „Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3“ von Sigma Aldrich oder das „Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate“ von Thermo Scientific verwendet. Die Luminollösungen stellen dabei das Substrat für die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase dar. Durch deren Aktivität wird Licht abgestrahlt, welches einen aufgelegten Röntgenfilm an entsprechender Stelle zu schwärzen vermag. Das Auflegen der Röntgenfilme auf die mit Entwicklerlösung benetzten und in Folie eingeschlagenen Membranen, sowie die Entwicklung der Filme erfolgte in der Dunkelkammer. Eine andere Art der Visualisierung über Chemilumineszenz mit dem ECL Plus Detektionskit (GE Healthcare) erfolgte in einer LAS-3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.4.14 Analytische Größenausschlusschromatographie

Die analytische Gelfiltration ist eine Methode zur Abschätzung des Molekulargewichtes, der Reinheit und des Multimerisierungszustandes von Proteinen und Protein-Komplexen. Hierbei werden typischerweise 100-150 µg gereinigte Proteine auf eine analytische Superdex 75 100/300 GL oder Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) an einem HPLC-System geladen und bei einer Flussrate von 0,5 mg/mL eluiert. Eine Detektion der eluierenden Proteine erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Mit Hilfe des Gelfiltrationsstandards von BioRad (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) konnte das Molekulargewicht der Proteinproben ermittelt werden.

3.4.15 Massenspektrometrie

Eine Methode zur Massenbestimmung ist die Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS), die hauptsächlich bei Biomolekülen wie zum Beispiel Proteinen und Oligonukleotiden verwendet wird. ESI-MS ist eine Technik zur Erzeugung von Ionen, die in der Massenspektrometrie verwendet wird. Dabei ist dieses Verfahren besonders schonend, da die Analyse bei atmosphärischem Druck durchgeführt wird. Durch den geringen Druck wird nur sehr wenig Energie auf die Ionen übertragen und führt kaum zu Fragmentierungen.

Unter Verwendung einer vorgeschalteten C4-Säule zur Entsalzung der Probe lassen sich zudem größere, hydrophobe Proteinen abtrennen. Für die Analyse wird der Analyt kontinuierlich in die Spitze einer leitfähigen Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Das zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer angelegte elektrische Feld durchdringt auch die Analytlösung und trennt die Ionen ähnlich wie bei der Elektrophorese. Ein Überschuss an gleichartig geladenen Ionen wird entgegengesetzt der angelegten Ladung zur Flüssigkeitsoberfläche gezogen und in Richtung der Gegenelektrode geleitet. Da die Oberflächenspannung an der Spitze der Kapillare dem elektrischen Feld entgegenwirkt, bildet sich hier ein typischer Flüssigkeitskegel (Taylor-Cone), der als feines Aerosol aus der Kapillare austritt. Wenn das elektrische Feld stark genug ist, bleibt der Konus stabil und emittiert von seiner Spitze einen kontinuierlichen, filamentartigen Flüssigkeitsstrom. Dieser Strom weist dabei nur einen Durchmesser von wenigen Mikrometern auf. Durch ein in Gegenstrom zugeführtes Trägergas, wie zum Beispiel Stickstoff, verdampft das Lösungsmittel in den Tröpfchen. Das hat zur Folge, dass der Radius abnimmt und die Ladungsdichte ansteigt. Auf Grund der Abstoßung gleichnamiger Ladungen, welche mit zunehmender Ladungsdichte immer größer wird, nähern sich die Tröpfchen ihrer Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit). An einem bestimmten Punkt überschreiten die Tröpfchen bezüglich ihrer Zusammensetzung, Größe und Ladung dieses Rayleigh-Limit und zerfallen in viele kleine Tröpfchen von nur wenigen Nanometer Durchmesser. Der Prozess, der letztlich zur Bildung der freien Gasphasen-Ionen führt, ist nicht eindeutig gesichert. Diese werden jedoch anschließend von dem Massenspektrometer

detektiert, in dem durch die erzeugten Ionen die Potentialdifferenz zwischen Sprayerkapillare und Orifice in das MS gelenkt werden (Lottspeich, 2008).

Als Laufmittel dienen in der ESI-MS 0,1 % TFA in ddH₂O (Puffer A) bzw. 0,08 % TFA in Acetonitril (Puffer B) mit einem Gradienten von 20 % zu 80 % Puffer B. Für Peptidproben wurde ein Gradient von 5 % bis 80 % Puffer B genutzt. Eine Auswertung der erhaltenen Massenspektren erfolgte mit dem Programm Xcalibur (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) und durch Dekonvolution mit dem Programm MagTran.

Eine andere Methode zur Massen und Sequenzbestimmung ist die *Peptide mass fingerprinting* (PMF) Analyse. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgte in der zentralen Bioanalytik (Universität Köln) durchgeführt. Beim PMF werden nach proteolytischen Verdau der Proteine mit Trypsin und Chymotrypsin die spezifisch entstandenen Peptidfragmente im Massenspektrometer analysiert. Die Massenpeaks der Peptide können mit Datenbanken verglichen werden und erlauben so die spezifische Zuordnung und Identifikation von Proteinen. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine per SDS-PAGE separiert, die Bande ausgeschnitten und zur anschließenden Analyse verschickt.

3.4.16 Kinaseassays

Die Bestimmung der Aktivität verschiedener Kinasen erfolgte in *in vitro* Assays unter Verwendung rekombinant gereinigter Kinasen, verschiedener Substratpeptide-/proteine und ATP in Anwesenheit oder Abwesenheit potentieller Regulatorproteine und Inhibitoren. Die Reaktion wurde mittels Filterbindungskinaseassays mit radioaktiv-markiertem [γ -³²P]-ATP, ESI-Massenspektrometrie, SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse untersucht und die Menge der übertragenen Phosphatgruppen von ATP auf das Substrat quantifiziert.

[γ -³²P]-ATP Kinaseassay

Zur Quantifizierung der Kinasereaktion wurde radioaktiv-markiertes ATP eingesetzt, dessen γ -Phosphatgruppen den β -Strahler ³²P enthielten und in einem Filterbindungsassay nach mehreren Waschschritten durch einen Szintillationszähler nachgewiesen werden konnte (Hastie et al., 2006). Für die Reaktionsansätze wurden typischerweise 35 μ L mit 0,2 μ M Kinase, 10 oder 100 μ M Substrat und 2 mM ATP in Kinasepuffer (150 mM Hepes pH 7,6, 34 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 2,5 mM Dithiothreitol, 5 mM β -Glycerolphosphat) verwendet. Die Reaktion wurde, falls nicht anders angegeben, für 15 min bei 30 °C und 350 rpm inkubiert und mit 50 mM EDTA abgestoppt. Die Ansätze wurden zu 15 μ L auf 2 cm² Optitran BA-S85 reinforced Membranen (Whatman) pipettiert. Die Membranen wurden zur Entfernung des überschüssigen ATPs dreimal jeweils 5 min mit 0,75 %iger Phosphorsäure gewaschen (mindestens 5 ml pro Membran) und anschließend wurde die Radioaktivität in einem Beckman Scintillationzähler (Beckman-Coulter) für 1 min bestimmt. Bei jeder Messung wurden jeweils Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Zeitabhängige

Messungen wurden zu bestimmten Zeitpunkten gestoppt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Die unterschiedlichen Regulationspartner und Inhibitoren wurden, wie in den jeweiligen Abschnitten angegeben, eingesetzt. Jede Messung wurde zwei oder dreimal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Detektion von Phosphorylierungen mittels SDS-PAGE und Western Blot

Daneben konnten die Kinasereaktionen auch mit nicht-strahlendem ATP durchgeführt und die Übertragung der Phosphatgruppen über die Laufverschiebung der CTD im SDS-PAGE Gel oder mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht werden. Dafür wurden zum Beispiel 10 µM GST-CTD_[52] mit 2 mM ATP und 0,2 µM Kinase bei 30 °C über einen definierten Zeitraum hinweg inkubiert. Die Reaktionen wurden zu den dargestellten Zeitpunkten durch Hinzufügen von SDS-Ladepuffer gestoppt. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 1 µg GST-CTD_[52] geladen und entweder mit Coomassie gefärbt oder für die Western Blot-Analyse auf Optitran BA-S85 Reinforced Nitrocellulose-Membranen (Whatman) transferiert. Das Blotting erfolgte unter Verwendung einer Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Zelle (Bio-Rad) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte in PBS mit 5 % BSA als Blockierungspuffer. Anschließend wurden die Membranen mit dem phosphorylierungsspezifischen Ratte-IgG Primärantikörper (3E10, 3E8 oder 4E12) im Blockierungspuffer für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden danach dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Anti-Ratte IgG Zweitantikörper (Santa Cruz) bei einer Verdünnung von 1:10000 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für 5 min mit PBS erfolgte die Visualisierung über Chemilumineszenz mit dem ECL Plus Detektionskit (GE Healthcare) in einer LAS-3000 intelligent Dark Box (Fujifilm) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Analyse von Phosphorylierungen mittels Massenspektrometrie

Die vorher beschriebenen Methoden dienen hauptsächlich der qualitativen Analyse von Protein- oder Peptidphosphorylierungsreaktionen sowie der Bestimmung der Proteinkinetik in Zeitverlaufexperimenten. Mit der Methode der Massenspektrometrie (Abschnitt 3.4.15) kann die absolute Anzahl an Phosphorylierungen auf dem Substrat bestimmt werden. Durch die Phosphorylierung von Proteinen kann eine charakteristische Erhöhung des Molekulargewichtes des Substrats um 80 Da je übertragener Phosphatgruppe massenspektrometrisch beobachtet werden. Für die Kinasereaktionen wurden 0,2 µM Kinase, 100 µM Substrat und 2 mM ATP verwendet und zu angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von 50 mM EDTA beendet. Die Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert und anschließend mittels ESI-MS analysiert. Unter Verwendung von 20 µL des Ansatzes zur Aufnahme eines ESI-Massenspektrums konnte die genaue Masse des vorliegenden Substrats im Ansatz bestimmt werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode

ermöglichte dies die direkte und exakte Quantifizierung der Anzahl der Phosphorylierungen des Substrats. Es besteht aber auch eine technische Obergrenze in der Analyse des Substrats. So konnte die volle-länge GST-CTD_[52] in diesem Assay nicht verwendet werden, da eine Massenbestimmung mittels ESI-MS aufgrund der Größe und Ladung nicht möglich war.

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine sehr sensitive Methode, bei der die Bindung zwischen zwei Reaktionspartnern durch Messung der Reaktionswärme, die als endotherme Energie dem System zugefügt werden muss oder als exotherme Energie frei wird, bestimmt wird (Wiseman et al., 1989). Zwei identische Kammern, die Messzelle und die Referenzzelle, sind in einem adiabatischen Mantel eingehüllt, um sie vor Wärmeaustausch zu schützen. Als Messsignal dient dabei ein Heizstrom an der Messzelle, der die Temperaturdifferenzen durch Freisetzung oder Aufnahme von Wärme zur Referenzzelle ausgleicht. Aus den Messungen können die folgenden Parameter direkt bestimmt werden: die Bindungsaffinität K_D , die Enthalpie ΔH und die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes n . Dieses geschieht durch die Integration der Flächen der einzelnen Injektionspeaks. Dabei wird aus der detektierten Wärmetönung die Enthalpie der Reaktion bestimmt, während der Verlauf der integrierten Wärmetönung gegen das in der Zelle vorliegende molare Verhältnis der Reaktanten die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K und der Stöchiometrie der Reaktion ermöglicht. Mit Hilfe dieser Daten kann über den Zusammenhang der Gibbs-Helmholtz-Gleichung und der Gleichgewichtskonstanten über die Freie Gibb'sche Energie sowohl die Entropie ΔS , als auch die freie Energie ΔG berechnet werden:

Formel 3.3: Gibb-Helmholtz-Gleichung

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{und} \quad \Delta G^0 = -RT \ln K$$

ΔH^0 und ΔS^0 können einen unterschiedlich starken Einfluss auf die freie Energie haben. So wird die Wärmeänderung von den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Protein, Ligand und Lösungsmittel bestimmt. Dazu gehören Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und strukturelle Änderungen der Solvathülle (Fisher and Singh, 1995). Die Änderung der Entropie wird durch weitere Faktoren charakterisiert. Durch das Auflösen der Solvathülle der Proteine erhöht sich die Entropie im System. Die Komplexbildung führt jedoch dazu, dass dem System Partikel entzogen werden, wodurch Seitenketten an Flexibilität verlieren und die Entropie sich verringert. Zusammenfassend wurden diese Effekte als Solvatisierungs- und Konformationsentropie beschrieben (Jelesarov and Bosshard, 1999).

In dieser Arbeit wurde ein ITC₂₀₀ Kalorimeter (MicroCal / GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet, um die Bindungsaffinitäten von Proteinen zu bestimmen. Dabei wurde eine 100-500 µM konzentrierte Proteinlösung aus der Spritze in 19 Injektionen zu je 2 µL zu einer 10-fach geringeren Konzentration des Proteins in der Messzelle titriert. Um unerwünschte Effekte auszuschließen wurden alle Proteinlösungen zudem gegen Puffer ohne Protein titriert. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Origin-ITC Software des Herstellers.

3.5.2 CD Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie ist eine wichtige Methode zur Konformationsermittlung von Proteinen, Polypeptiden und anderen chiralen Stoffen. Es handelt sich um eine Methode, mit der die optische Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung untersucht werden kann. Sie beruht auf der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit Materie, z.B. Wechselwirkungen mit der Lösung eines optisch aktiven Stoffes. Ein CD-Spektrum macht Angaben darüber, wie circular polarisiertes Licht von optisch aktiven Molekülen absorbiert wird. Dabei können grundsätzlich zwei verschiedene Effekte auftreten:

Die linear polarisierte Welle wird beim Durchlaufen des Mediums wellenlängenabhängig in ihrer Polarisationsrichtung gedreht, man spricht dann von optischer Rotationsdispersion (ORD). Werden die beiden zirkular polarisierten Komponenten, aus denen eine linear polarisierte Welle zusammengesetzt ist, zusätzlich verschieden stark absorbiert, so liegt Circular dichroismus vor. Die Messgröße beim CD ist der Absorptionsunterschied zwischen links (A_L) und rechts (A_R) circular polarisiertem Licht.

Formel 3.4: Absorptionsunterschied von links und rechts polarisiertem Licht

$$\Delta A = A_L - A_R$$

Der Zusammenhang von ΔA und $\Delta \epsilon$ ist durch das Lambert-Beer'sche Gesetz gegeben:

Formel 3.5: Lambert-Beer'sche Gesetz

$$\Delta A = -\log \frac{I}{I_0} = \Delta \epsilon \cdot c \cdot d$$

mit

I: Intensität des transmittierten Lichts

I_0 : Intensität des einfallenden Lichts

c: Konzentration [g/mol]

d: Schichtdicke [cm]

$\Delta \epsilon$: molare dekadische Extinktionskoeffizient [mol/g·cm]

ΔA : Absorption/Extinktion.

Die apparanten CD-Daten werden als Elliptizität Θ ausgedrückt. Beide Angaben können durch einen konstanten Faktor ineinander umgerechnet werden:

Formel 3.6: Elliptizitätsberechnung

$$\Theta = 2,303 \cdot \Delta A \cdot 180/4\pi \text{ [deg]}$$

Für Makromoleküle wie z.B. Proteine wird die Konzentration in molare Elliptizität pro Aminosäurerest angegeben. Hierfür ist die molare Konzentration der Aminosäurereste nötig. Man erhält sie, indem man die Konzentration durch die molaren Rest-Massen (MRW) dividiert. Die MRW erhält man durch Division der molekularen Masse durch $N - 1$, wobei N die Anzahl der Aminosäuren ist.

Formel 3.7: Berechnung der Elliptizität pro Aminosäurerest

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \text{MRW} \cdot \frac{\Theta}{10} \cdot c \cdot d \text{ [deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol]}$$

mit

Θ : Elliptizität [deg]

d: Weglänge der Zelle [cm]

c: Konzentration [g/mol]

Die Circular dichroismus-Spektren eines Proteins können u.a. verwendet werden, um den Anteil der Sekundärstrukturelemente im Protein zu bestimmen. α -helikale Bereiche geben beispielsweise ein sehr viel stärkeres Signal im kurzwelligen UV-Bereich als β -Faltblatt-Bereiche. Typisch für eine α -helikale Sekundärstruktur ist ein Maximum bei 190 nm und zwei Minima bei 208 nm und 222 nm. Eine β -faltblattreiche Sekundärstruktur zeigt im Spektrum ein Maximum bei 198 nm und ein Minimum bei 215 nm. Das CD-Spektrum im längerwelligen UV-Bereich gibt hingegen gute Anhaltspunkte für eine korrekte native Faltung eines Proteins.

Die CD-Spektren wurden an einem J-815 Spektrometer (Jasco, Tokio, Japan) bei Raumtemperatur in einer 10 mm dicken Quarzküvette aufgenommen. Die Messung erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min, 1 nm Bandbreite, 50 mdeg Empfindlichkeit, 0,1 nm Auflösung, und einer Zeitkonstante von 0,5 s. Die Messungen wurden bei 25 °C und mit 0,2 mg/mL in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, in einer Hellma 106-QS Küvette (0,5 mm Schichtdicke) durchgeführt. Für das Pufferspektrum werden 10 und für die Proteinproben 20 Messungen aufgenommen. Die Proteinspektren wurden um das Spektrum des reinen Lösungsmittels korrigiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Origin 9.0 Pro. Zur Überprüfung der Sekundärstruktur wurden Algorithmen des Servers Dichroweb verwendet (Lobley et al., 2002; Whitmore and Wallace, 2008).

4 Ergebnisse

Die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA Polymerase II ist ein essentieller Schritt während der Transkription. Sie spielt nicht nur bei dem Übergang vom promotorproximalen Pausieren in die produktive Transkriptionselongation eine wichtige Rolle, sondern ist auch für die Bindung von Prozessierungsfaktoren und der Initiation der Transkription von Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Kinasen dargestellt und auf ihre Substratspezifität für die CTD hin analysiert werden. Dabei ist P-TEFb eine der am meist untersuchten Kinasen, die mit verschiedenen Regulatoren wechselwirkt. Zwei dieser Regulatoren sollten näher beschrieben und analysiert werden. AFF4 und Brd4 sind beide positive Regulatoren, die P-TEFb in einen aktiven Zustand versetzen können. In diesem Zusammenhang wurde der Cofaktor c-Myc untersucht, der als Substrat von P-TEFb vor kurzem identifiziert wurde. Des Weiteren konnte ein potenter Inhibitor, Dinaciclib, für verschiedene transkriptionsregulierende Kinasen gefunden und charakterisiert werden.

4.1 Darstellung, Aktivierung und Analyse von Erk1 und Erk2

Die Aktivität und Spezifität von Erk1 und Erk2 als CTD Kinasen war zu Beginn dieser Arbeit nur unzureichend charakterisiert. Ende der 90er Jahre wurde Erk als Transkriptionskinase entdeckt, allerdings wurde sie bislang nicht näher beschrieben (Bonnet et al., 1999; Trigon et al., 1998). Im Folgenden sollte nun mit analytischen und antikörperbezogenen Methoden die Phosphorylierung der CTD durch Erk1 und Erk2 analysiert werden.

Die Analyse von Erk1 und Erk2 setzte die rekombinante Darstellung der Kinasen im aktiven Zustand voraus. Die Erk Kinasen können in *E. coli* exprimiert werden und durch Coexpression mit der Mitogen-aktivierten Kinase MEK (engl.: *Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase*) in einen aktiven Zustand versetzt werden. MEK ist Teil der Ras-Raf-MEK-Erk Signaltransduktion Kaskade und phosphoryliert Erk an den Positionen Thr183 und Tyr185 (Khokhlatchev et al., 1997). Die Phosphorylierung dieser Aminosäurereste muss gewährleistet werden, da im Anschluss die Substratspezifität der Kinasen geklärt werden sollte.

Die Reinigung der Kinasen erfolgte über GST-Affinitätschromatographie und nach Abtrennung des Affinitätstags über Größenausschlusschromatographie. Da Reinheit, Homogenität und Faltung eine der wichtigsten Voraussetzungen von Proteinen sind, wurden die Kinasen mittels SDS-PAGE, analytischer Gelfiltration, ESI-Massenspektrometrie und CD-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 4.1).

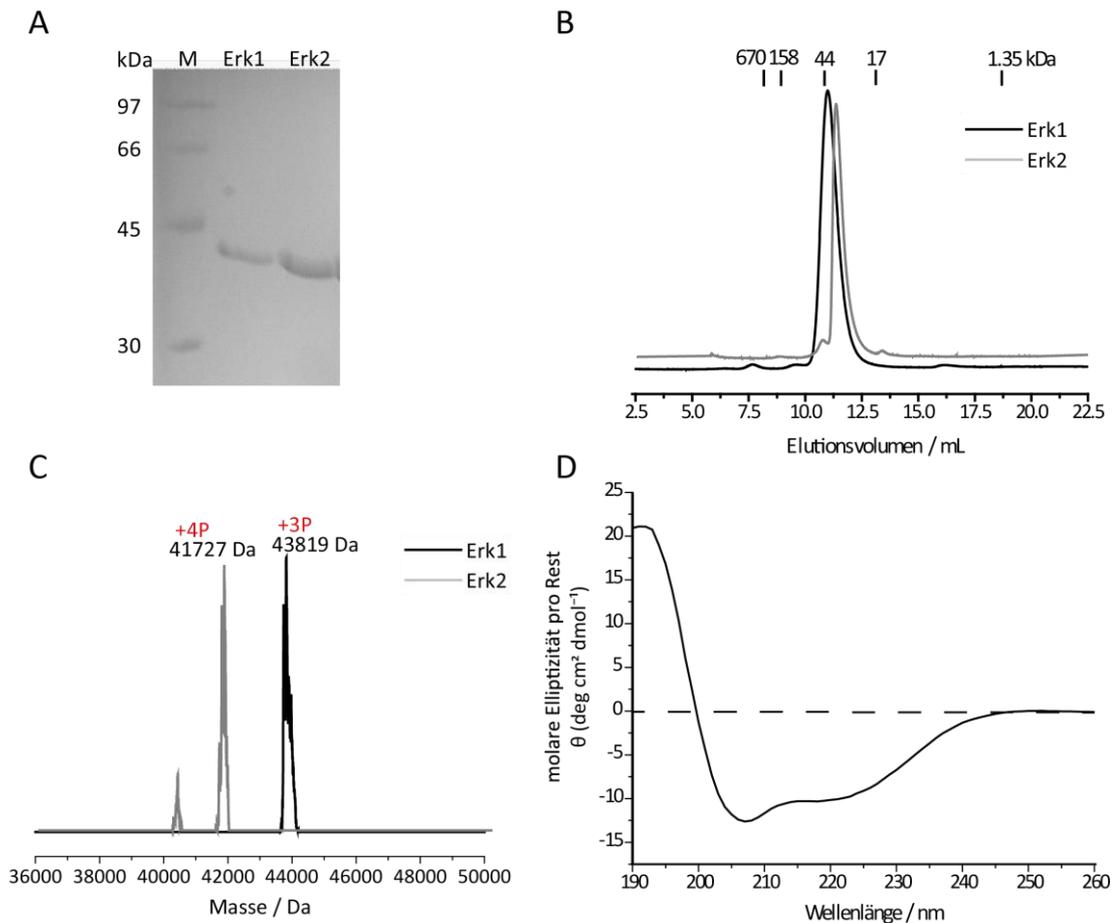


Abbildung 4.1: Charakterisierung der humanen Kinasen Erk1 und Erk2

A: Darstellung der Erk1 und Erk2 Kinase mittels SDS-PAGE Analyse. **B:** Analytische Größenausschlusschromatographie von Erk1 und Erk2. **C:** ESI-Massenspektrum der gereinigten Erk1 und Erk2 Kinase. **D:** CD-spektroskopische Bestimmung der Sekundärstruktur von Erk1.

Abbildung 4.1 A zeigt mittels Coomassie-gefärbter SDS-PAGE die erfolgreiche Aufreinigung der Kinasen. Die Bande in Spur 2 zeigt die Erk1 Kinase, die ein Molekulargewicht von 43.579 Da hat. In Spur 3 ist Erk2 mit einem Molekulargewicht von 41.403,7 Da dargestellt. Als Größenvergleich diente ein LMW Marker der Firma GE Healthcare. In der analytischen Gelfiltration eluierten sowohl Erk1 als auch Erk2 als einzelner, homogener Peak mit einem apparenten Molekulargewicht von 43 kDa bzw. 41 kDa (Abbildung 4.1 B). Dies deckt sich mit der berechneten Masse des Proteinkomplexes von 43,6 kDa und lässt auf eine globuläre monomere Proteinfaltung schließen.

Ein Massenspektrum von Erk1 und Erk2 wurde bei einer Konzentration von 10 μg durchgeführt. Eine Analyse per ESI-MS und Auswertung mit Hilfe des Programms Xcalibur und MagTran ergab eine Masse von 43.819 Da für Erk1 und eine Masse von 41.404 Da für Erk2 (Abbildung 4.1 C). Die detektierte Abweichung von 240 Da gegenüber dem berechneten Wert für Erk1 lässt auf drei Phosphorylierungen schließen. Dies spricht für eine erfolgreiche Aktivierung von Erk während der Coexpression in *E. coli* mit der

Kinase MEK. Eine Massenzunahme von 323 Da für Erk2 lässt auf eine vierfache Phosphorylierung schließen und zeigt ebenfalls eine Aktivierung der Kinase an.

In Abbildung 4.1 D ist ein CD Spektrum von Erk1 gezeigt. Dazu wurden 5 μM Protein in 5 mM KPi -Puffer bei pH 7,5 eingesetzt. Die Auswertung des Spektrums mit dem Programm Dichroweb (Whitmore and Wallace, 2008) ergab eine überwiegend α -helikale Struktur von Erk1.

4.1.1 Erk1 und Erk2 als CTD Kinasen und deren Inhibition

Da eine Aktivität von Erk1 und Erk2 auf die CTD beschrieben wurde, sollte im Folgenden eine Aktivität, der durch Coexpression mit MEK phosphorylierten, rekombinant gereinigten Kinasen, überprüft werden. Hierzu wurde in einem Assay mit radioaktiv-markiertem Co-Substrat ATP zunächst die CTD als Substrat getestet und anschließend sowohl zeitabhängig als auch konzentrationsabhängig Messungen durchgeführt.

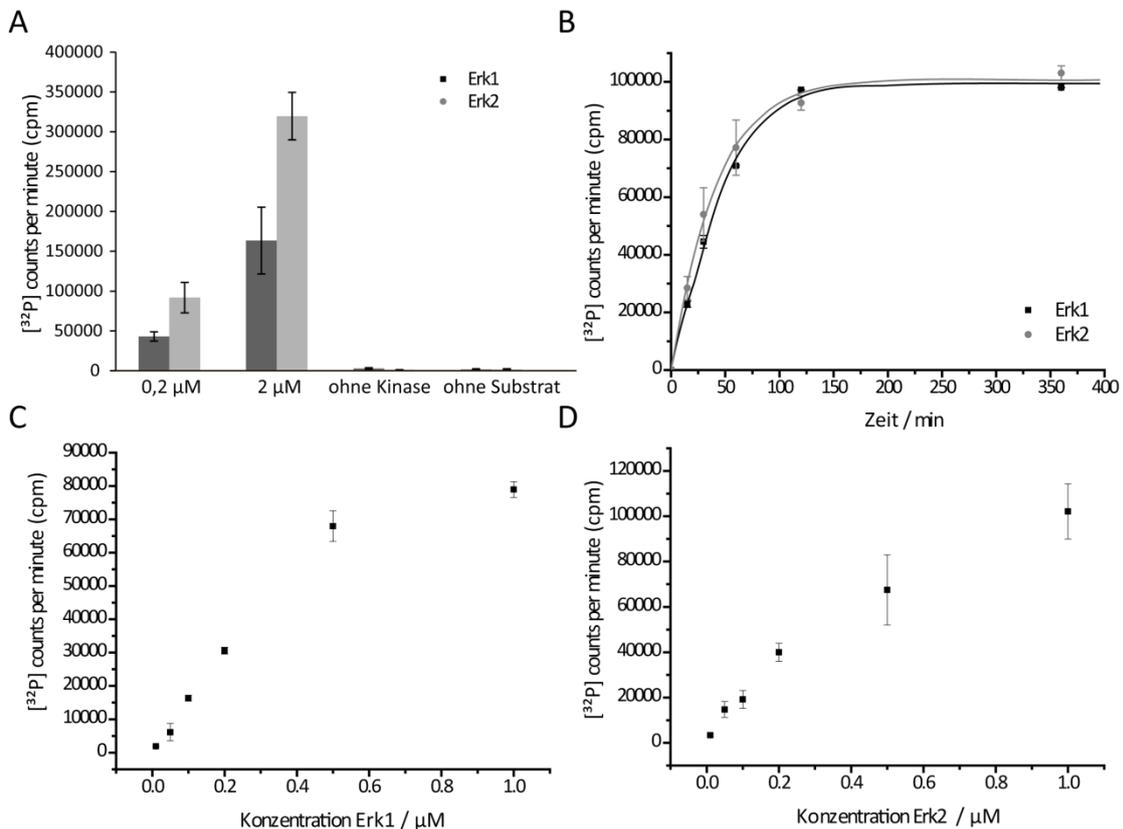


Abbildung 4.2: Aktivität von Erk1 und Erk2

A: Aktivität von gekauften Erk1 und Erk2 auf die CTD, bei zwei verschiedenen Konzentrationen der Kinasen. **B:** Zeitverläufe der Kinasereaktion von Erk1 und Erk2 auf die CTD. **C:** Phosphorylierung der CTD in Abhängigkeit ansteigender Konzentration von Erk1. **D:** Phosphorylierung der CTD in Abhängigkeit ansteigender Konzentration von Erk2.

In Abbildung 4.2 A wurden jeweils 0,2 μM und 2 μM der bei ProQianse (Freiburg) bezogenen Kinasen Erk1 und Erk2 mit 100 μM GST-CTD_{[9]KKK} Substrat und 2 mM [γ -³²P] ATP eingesetzt, um die Aktivität der Kinasen zu bestätigen. Die Reaktion wurde bei 30 °C für 15 min durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten zum einen ein Ansatz ohne Substrat, um eine potentielle Kontamination der Proteinproben durch Substrat auszuschließen, und zum anderen ein Austausch des Substrats gegen GST, um eine Phosphorylierung der Kinase an den GST-tag der CTD auszuschließen. Es konnte eine eindeutige Aktivität von Erk1 und Erk2 auf die RNAP II CTD gezeigt werden. Die hohen Zählraten der Reaktion lassen darauf schließen, dass die Kinasen das Substrat schnell und effizient phosphorylieren und die CTD damit ein sehr gutes Substrat für Erk ist.

Für weitere Experimente und eine genauere Charakterisierung der Kinasen wurde als nächstes die Kinaseaktion mit selbst exprimierten Kinasen in Abhängigkeit der Zeit radioaktiv gemessen. Zu einem definierten Zeitpunkt wurde die Übertragung der γ -Phosphatgruppe eines ATP- Moleküls durch Erk auf ein Substratmolekül ermittelt. Die Kurven zeigen für beide Kinasen einen hyperbolischen Verlauf und machen deutlich, dass schon nach gut 2 ½ h ein Endpunkt und somit eine vollständige Phosphorylierung der CTD erreicht wurde. In weiteren Assays wurde daher immer ein kürzeres Zeitintervall gewählt, um nicht in eine Sättigungsphase zu gelangen, die die Ergebnisse verfälschen würden. Auffällig ist, dass hier beide Kinasen ähnlich schnell und effizient sind, was auf eine gleiche Umsetzung des Substrats schließen lässt.

In Abbildung 4.2 C und D wurden schließlich verschiedene Erk1 bzw. Erk2 Konzentrationen eingesetzt, um den Sättigungsbereich und damit einen Einsatz von zu viel Kinase in weiteren Untersuchungen zu verhindern und gleichzeitig den Kinaseverbrauch gering zu halten. Es wird deutlich, dass bei dem Einsatz von 1 μM Kinase zu 100 μM GST-CTD_{[9]KKK} und 2 mM ATP noch eine Steigerung der Phosphorylierungsreaktion erzielt wurde. In nachfolgenden Experimenten wurden somit standardmäßig, wenn nicht anders angegeben, 0,2 μM Kinase mit 100 μM Substrat über einen Zeitraum von 15 min eingesetzt.

Der Phosphorylierungszustand der CTD kann in den vorher gezeigten radioaktiven Kinaseassays nur abgeschätzt werden und sollte nun genauer quantifiziert werden. Hierzu wurde zu jedem im radioaktiven Kinaseassay genommenen Zeitpunkt separat ein ESI-MS Spektrum aufgenommen, um die Anzahl der zusätzlichen Phosphatgruppen zeitaufgelöst zu bestimmen.

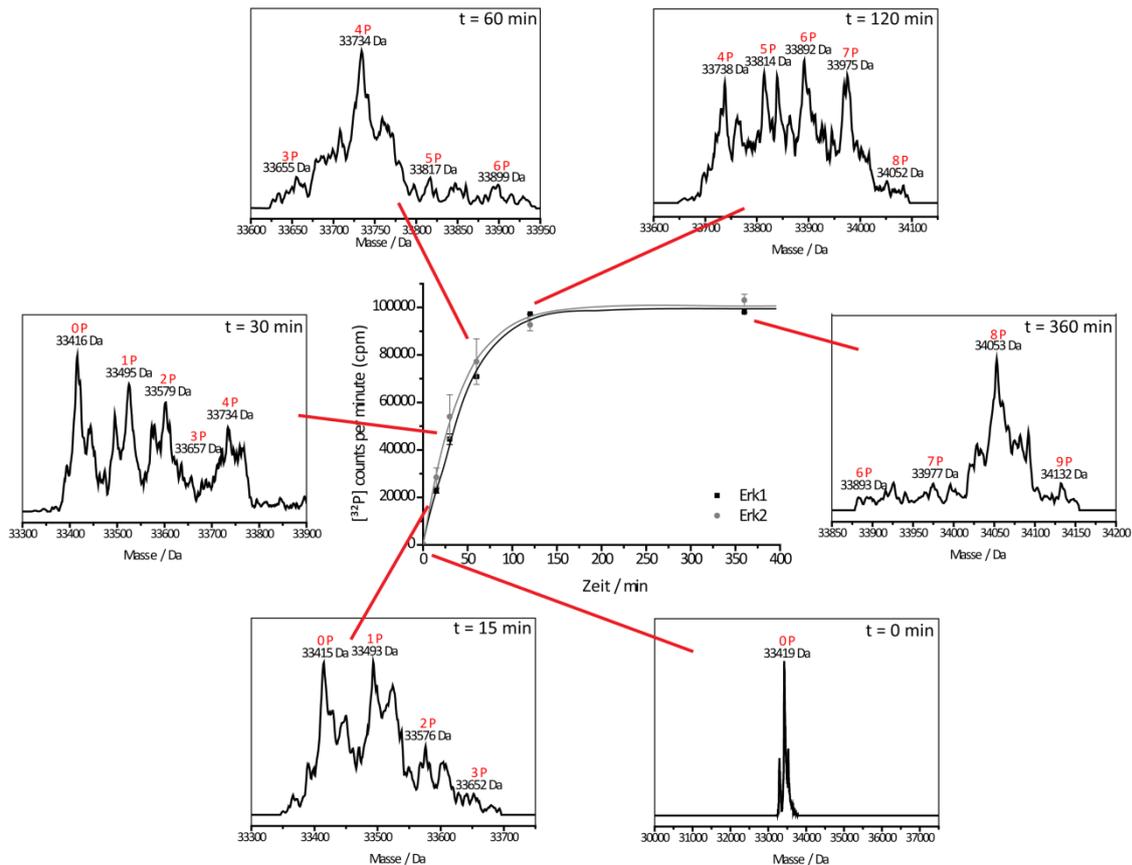


Abbildung 4.3: Bestimmung der Phosphorylierungsanzahl der CTD durch Erk1

Dargestellt sind die zeitabhängigen ESI-MS Spektren der Kinasereaktion von $0,2 \mu\text{M}$ Erk1 mit $100 \mu\text{M}$ GST-CTD_{[9]KKK}. Die Zeitpunkte wurden analog zu den radioaktiver Kinaseassay Zeiten genommen.

In Abbildung 4.3 ist die Kinasereaktion von Erk1 und Erk2 zeitaufgelöst dargestellt. Die Masse des in diesem Experiment angesetztten CTD Substrats mit neun Wiederholungen und flankierenden Lysinen beträgt 33.419 Da . Die positiv geladenen Lysine dienen als Ladungsanker, die die hochgradig negativen Ladung der Phosphorylierungen durch Kinasen kompensieren sollen und so die Messung per Elektronenspray-Ionisation möglich machen soll. Nach 15 min Inkubationszeit mit Erk konnten schon bis zu 3 Phosphorylierungen nachgewiesen werden. Die Anzahl des Phosphorylierungsgrads der CTD nimmt mit fortschreitender Zeit stetig zu. Der Endpunkt der Reaktion lag nach 360 min bei 9 Phosphorylierungen, was genau einer Phosphorylierung von jeder Wiederholung der CTD entspricht. Dieses Ergebnis deutet damit auf eine spezifische Phosphorylierung an einer einzigen Position der CTD pro Repeat hin. Diese Position der Phosphorylierung konnte jedoch in diesem Experiment noch nicht geklärt werden und stellt die Grundlage der weiteren Analysen dar.

4.1.2 Substratspezifität von Erk

Während der Transkription unterläuft die CTD eine Reihe von Phosphorylierungen. Dabei können fünf der sieben Aminosäuren in einem Repeat phosphoryliert werden. Jede dieser Phosphorylierungen hat eine andere Aufgabe. So wurde die Ser5 Phosphorylierung der CTD als Initiation der Transkription beschrieben, die Ser7 und Ser5 Phosphorylierung als Beginn der produktiven Elongation und die Ser2 Phosphorylierung als Terminationszeichen (Mayer et al., 2010). Daher ist die Aufklärung der Substratspezifität verschiedener Kinasen auf die CTD von großem Interesse. Bis heute konnte in vielen Fällen noch nicht geklärt werden, welche Kinase genau für welche Phosphorylierung verantwortlich ist, wie viele Phosphorylierungen gleichzeitig existieren können und in welchen Kombinationen sie gegeben falls gesetzt werden. Im nächsten Abschnitt soll daher die Spezifität von Erk analysiert werden.

Um einen handhabbaren und vereinfachten Assay zu generieren, wurden in Zusammenarbeit mit Christian Böskens kurze Peptide mit jeweils 3 Wiederholungen der Heptasequenz der consensus CTD als Substrate entworfen. In Zusammenarbeit mit Sascha Gentz, der viele der vorphosphorylierten Peptide synthetisierte, konnten so Substrate hergestellt werden, die sowohl in ESI-MS als auch in radioaktiven Kinaseassays verwendet werden konnten. Die Vorphosphorylierung sollte dabei die Koexistenz von Phosphorylierungen durch Kinasen imitieren. Zur Optimierung der Ionisationseigenschaften in der ESI-MS sowie für eine bessere Ladungsverteilung zur Immobilisation auf Membranen in Kinaseassays wurden die Peptide über einen Polyethylenglykol-(PEG)-Linker mit zwei Argininen verbunden. Um die Substrate in ihrer natürlichen Form zu mimieren wurde bei neu synthetisierten Peptiden dazu übergegangen Acetylierungen vor die Sequenzen anzufügen und damit einen freien Amino-Terminus zu verhindern. Einige Peptide wurden von der Firma Biosyntan hergestellt. In Abbildung 4.4 sind die verschiedenen Peptide und deren berechnete Massen zur Übersicht dargestellt.

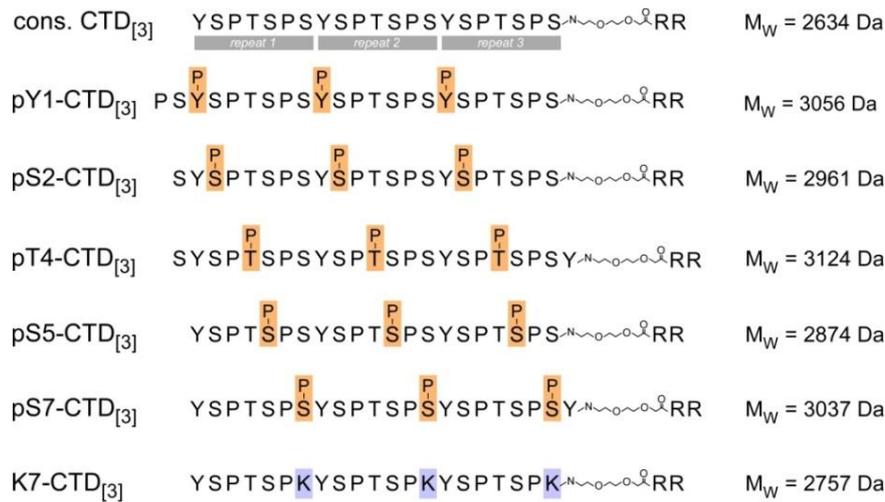


Abbildung 4.4: Design der CTD Substratpeptide

Die Peptide enthielten jeweils drei Heptapeptid-Wiederholungen mit unmodifizierter consensus Sequenz (cons. CTD_[3]), durchgängig Phosphatgruppen an Tyr1, Ser2, Thr4, Ser5 oder Ser7 (entsprechend als pY1-CTD_[3], pS2-CTD_[3], pT4-CTD_[3], pS5-CTD_[3] und pS7-CTD_[3] bezeichnet) oder einem Lysin an Position 7 (K7-CTD_[3]).

Die Peptide wurden so entworfen, dass sie durchgängig an einer Position mit einer Phosphatgruppe modifiziert wurden, jeweils pY1-CTD_[3], pS2-CTD_[3], pT4-CTD_[3], pS5-CTD_[3] und pS7-CTD_[3], oder anstatt eines Serins an Position 7 ein Lysin enthielten, K7-CTD_[3], was der häufigsten Abweichung von der consensus Sequenz im distalen Teil der human CTD entspricht (Abbildung 2.4). Um die Kinaseaktivität von Erk in den Kontext der Phosphorylierungszustände der CTD einordnen zu können, wurde in einem radioaktiven Kinaseassay mit 0,2 µM Kinase, 100 µM Substrat, 2 mM ATP eine Serie von CTD-Peptiden mit jeweils drei Heptapeptid-Wiederholungen verwendet. Die Inkubation erfolgte über 15 min bei 30 °C.

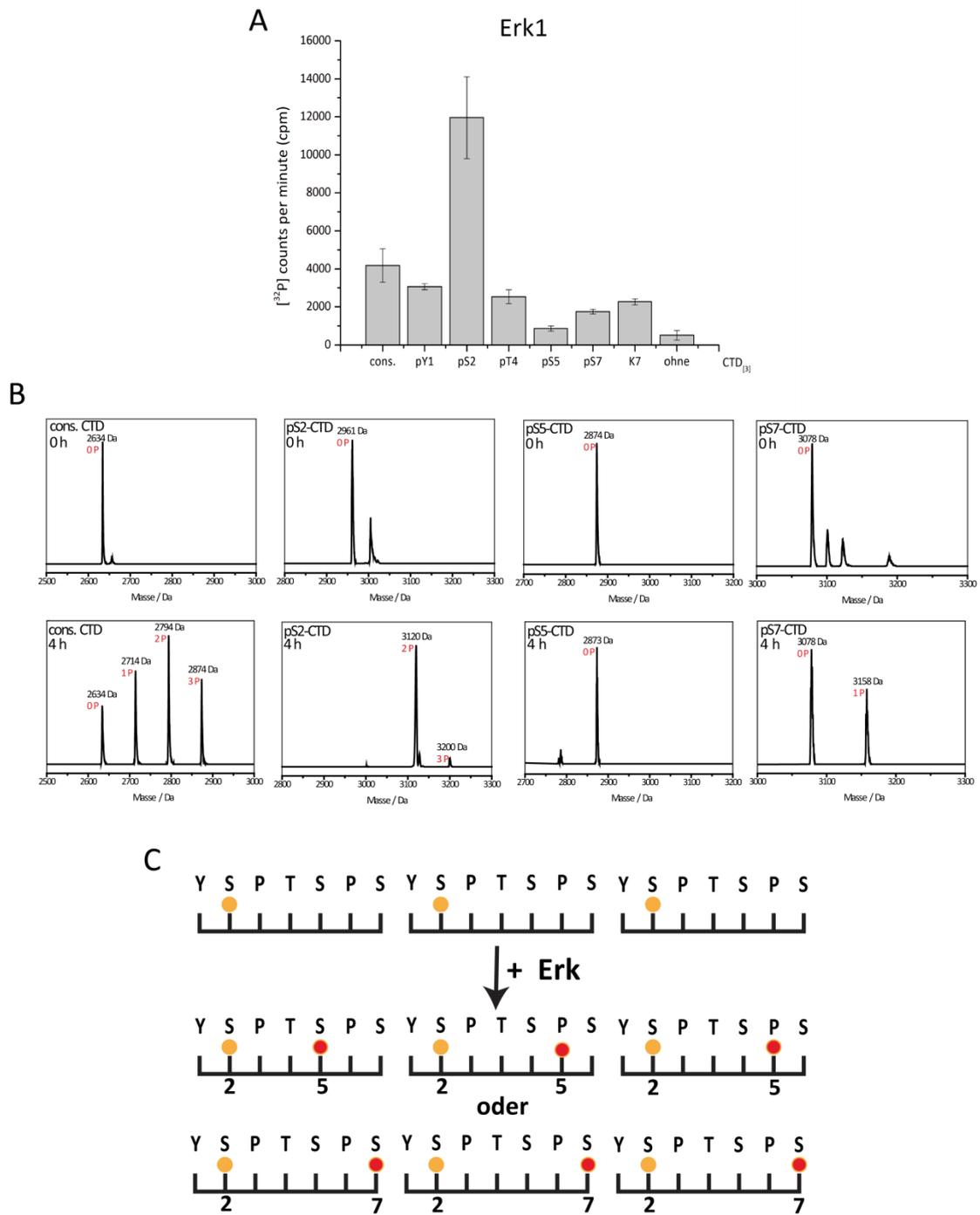


Abbildung 4.5: Bestimmung der Substratspezifität von Erk1

A: Messung der Radioaktivität in einem radioaktiven Kinaseassay von 0,2 μ M Erk1 mit 100 μ M CTD-Peptid, 1 mM ATP über 15 min bei 30 °C. **B:** ESI-MS-Spektren der CTD-Peptide cons. CTD_[3], pS2-CTD_[3], pS5-CTD_[3], pS7-CTD_[3] vor und nach vier stündiger Inkubation mit Erk1. **C:** mögliches Phosphorylierungsmuster von Erk1 auf dem pS2-CTD_[3]-Peptid.

Überraschenderweise wurde die höchste Kinaseaktivität von Erk1 in diesem Assay für das pS2-CTD_[3] Peptid gemessen (Abbildung 4.5 A). Peptide mit Phosphorylierungen an Tyr1, Thr4 und Ser7 wurden im Vergleich dazu deutlich schlechter phosphoryliert. Für das pS5-CTD_[3] Substrat wurde so gut wie keine Aktivität detektiert. Die cons. CTD_[3] stellt ein ähnlich gutes Substrat wie die CTD mit Lysin an Position 7 (K7-CTD_[3]) dar. Für beide Peptide ist die Aktivität jedoch gut dreimal geringer, im Vergleich zu der Vorphosphorylierung an Position Ser2. Anschließend wurden mittels ESI-MS die Massen der Peptide vor und nach Inkubation mit Erk1 bestimmt, um die Phosphorylierung der Peptide nachzuweisen (Abbildung 4.5 B).

Abbildung 4.5 B zeigt die ESI-MS Spektren vor und nach 4 stündiger Inkubation bei 30 °C mit 0,2 µM Erk1. Bei der cons. CTD_[3] konnte eine Massenzunahme von bis zu 240 kDa beobachtet werden. Dies entspricht einer dreimaligen Phosphorylierung durch Erk1. Es können zudem auch keine, eine und zwei Phosphorylierung gefunden werden. Wie vorher schon gezeigt, können auch hier nicht mehr Phosphatgruppen detektiert werden als Wiederholungen der Heptasequenz existieren. Dies lässt darauf schließen, dass nur eine bestimmte Aminosäure pro Wiederholungssequenz phosphoryliert werden kann. Bei einem synthetisierten Peptid, welches Phosphorylierungen an der Ser2 Position aufweist, konnte vornehmlich eine Massenzunahme von 160 Da bestimmt werden. Dies entspricht einer Modifikation von zwei Phosphorylierungen auf einem Peptid und zeigt, dass Erk entweder Serin 5 oder Serin 7 modifiziert (Abbildung 4.5 C). Bei den pS5 und pS7 vorphosphorylierten CTD-Peptiden konnte keine bzw. nur eine Phosphorylierung bestimmt werden. Diese Phosphorylierung an dem pS7-Substrat könnte auf eine unspezifische Phosphorylierung hindeuten.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass entweder das Serin an Position 5 oder an Position 7 bevorzugt phosphoryliert wird. Um diese Ergebnisse zu bestätigen und die Kinetiken der Modifizierungen zu bestimmen, wurden zeitaufgelöste Kinaseassays mit radioaktiv-markiertem Co-Substrat ATP durchgeführt. Zunächst wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Phosphateinbau in cons. CTD_[3], pS2-CTD_[3], pS5-CTD_[3] und pS7-CTD_[3] bestimmt. Anschließend wurden Substrate verwendet, die an Ser2 vorphosphoryliert waren, aber aufgrund von Mutageneseexperimenten keine Phosphorylierungsoption an Ser5 oder an Ser7 aufwiesen (Abbildung 4.6 D). Die Serine wurde in diesem Fall gegen Alanine ausgetauscht. Alanin hat als Seitenkette nur eine Methylgruppe und kann daher nicht durch eine Phosphatgruppe modifiziert werden.

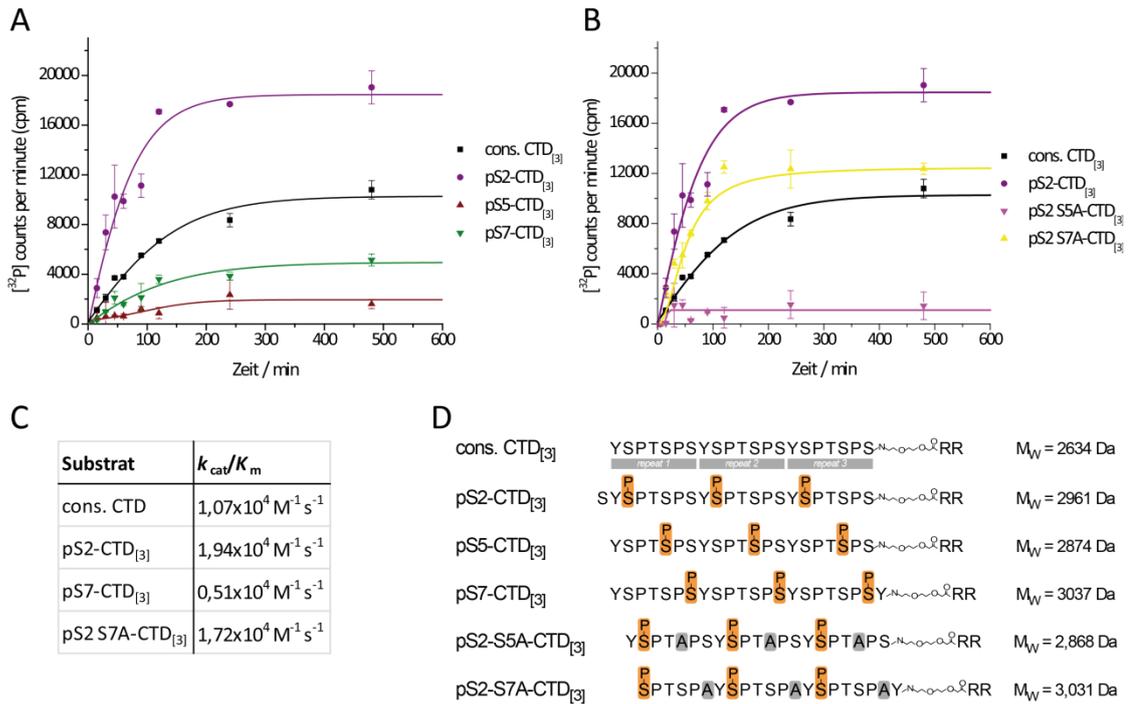


Abbildung 4.6: Kinetiken der Erk vermittelten Phosphorylierung auf verschiedenen CTD-Peptiden

Dargestellt sind die zeitabhängigen, radioaktiven Kinasereaktionen von 0,2 μM Erk1 mit 100 μM Substratpeptid. **A:** cons. CTD_[3], pS2-CTD_[3], pS5-CTD_[3] und pS7-CTD_[3]. **B:** cons. CTD_[3], pS2 S5A-CTD_[3], pS2 S7A-CTD_[3] und pS2-CTD_[3]. **C:** Tabelle der berechneten k_{cat}/K_m Werte. **D:** Design der verwendeten Substratpeptide.

Wie aus den vorhergegangenen Experimenten zu erwarten war, ist ein deutlich schnellerer Einbau des Phosphats bei einer Vorphosphorylierung an Ser2 im Vergleich zu einer unphosphorylierten CTD zu erkennen. Dies deutet auf eine Stimulation durch eine Vorphosphorylierung an Position Serin 2 hin. Unter Anwendung der Michaelis-Menten Kinetik konnte der k_{cat}/K_m Wert mit $1,94 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden und liegt damit 1,8-fach höher als auf der consensus CTD mit einem k_{cat}/K_m Wert von $1,07 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Wie schon die ESI-MS Daten zeigten, konnte auch in einem Zeitverlaufsassay ein pS5 Substrat nicht oder nur marginal durch Erk phosphoryliert werden. Die leichte Erhöhung ist auf eine Hintergrundaktivität zurückzuführen. Das pS7-CTD_[3] Substrat zeigt eine leichte Modifikation durch Erk1 mit einem k_{cat}/K_m Wert von $0,51 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die hohe Aktivität von Erk1 auf einem pS2-CTD_[3] Substrat könnte auf eine Stimulation durch pS2 zurückzuführen sein. Zudem kann man durch die Höhe der Zählraten Rückschlüsse auf die Phosphorylierungsanzahl ziehen. Sie deutet darauf hin, dass nicht nur eine Phosphorylierungsposition, sondern eventuell zwei Phosphorylierungen innerhalb eines Repeats vorliegen. Diese Hypothese lässt darauf schließen, dass keine vollständige Phosphorylierung der cons. CTD_[3] mit drei Phosphorylierungen vorliegt. Dabei könnte das pS2-CTD_[3] Substrat vollständig auf jeder Wiederholung mit einer Phosphatgruppe besetzt sein und das cons. CTD_[3] Substrat nicht. Diese Hypothese würde sich mit den Ergebnissen

aus den ESI-MS Assays decken. Hier konnten auf einem pS2-CTD_[3] Substrat bis zu drei Phosphorylierungen gefunden werden.

In Abbildung 4.6 B ist nun die Phosphorylierung von Erk1 auf den beiden Substraten, die an Position 2 eine Phosphorylierung aufweisen, aber einmal an Position 5 und einmal an Position 7 zu Alanin mutiert sind, dargestellt. Zum Vergleich wurden nochmal die consensus und die pS2-CTD_[3] abgebildet. Interessanterweise konnte das pS2 S5A-CTD_[3] Peptid nicht phosphoryliert werden. CTD-Peptide mit pS2 S7A hingegen wurden genau wie das pS2 Substrat von Erk1 phosphoryliert. Der k_{cat}/K_m Wert von $1,72 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ergab eine kinetische Aktivität für die pS2-S7A Mutante, die vergleichbar mit der des pS2-CTD_[3] Substrats ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nur Serin 5 durch Erk1 phosphoryliert wird und eine Serin 7 Phosphorylierung ausbleibt. Für eine Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine selbst exprimierte GST-CTD mit 52 Wiederholungen, die natürlich im Menschen vorkommt, mit Erk1 phosphoryliert und die Phosphorylierung mit Hilfe von Antikörpern (pSer2 (3E10), pSer5 (3E8) und pSer7 (4E12)) detektiert (Abbildung 4.7).

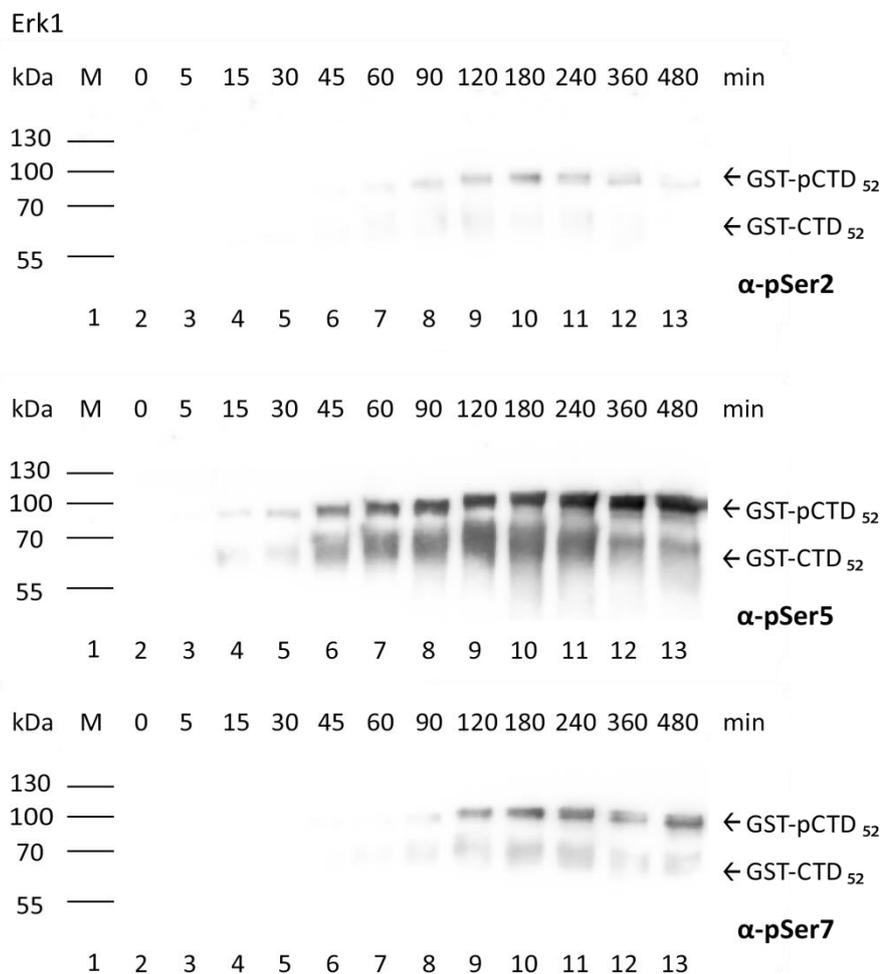


Abbildung 4.7: Western Blots der Erk1 abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD_[52]
Zeitabhängige Phosphorylierung von 10 μM GST-CTD_[52] mit 0,2 μM Erk1 im Western Blot mit Antikörpern gegen pSer2, pSer5 und pSer7.

In diesem experimentellen Ansatz wurden 10 μM GST-CTD_[52] mit 0,2 μM Erk1 und 2 mM ATP versetzt, bei 30 °C inkubiert und die Reaktion zu den oben genannten Zeiten gestoppt. Bei der nachfolgenden Gelelektrophorese wurde auf gleiche Mengen an Protein und auf gleiche Laufzeiten der verschiedenen Gele in der Elektrophorese geachtet, indem gleiche Volumina aus einem großen Ansatz nach den jeweiligen Zeitpunkten entnommen wurden und gleiche Mengen auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen wurden. Nach dem Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen pSer2 (3E10), pSer5 (3E8) und pSer7 (4E12) konnte der Blot mittels LAS-3000 intelligent Dark Box von Fujifilm untersucht werden. Mit zunehmender Zeit nimmt auch die Bandhöhe der CTD zu. Dies ist auf die hyperphosphorylierte I_o-Form der CTD zurückzuführen, da die CTD wahrscheinlich durch die Phosphorylierung eine Konformationsänderung durchläuft. Die I_o-Form der CTD läuft somit in einem SDS-Gel langsamer als die I_a-Form, die keine Phosphorylierungen aufweist. Nach 15 Minuten sind die ersten Phosphorylierungen zu erkennen, die mit der Zeit zunehmen. Nach 120 Minuten ist eine Verschiebung der GST-CTD_[52] zu der I_o-Form zu verzeichnen. Nach 360 Minuten ist die CTD von der I_a-Form fast vollständig in die I_o-Form gewechselt und zeigt eine hochgradig phosphorylierte CTD an. Dies weist aufgrund der Stärke des Signals und der fast vollständigen Verschiebung der CTD zur I_o-Form auf eine sehr potente Phosphorylierung durch Erk1 hin. In dem Western Blot ist ein starkes Signal an Ser5 zu erkennen. An Ser7 und Ser2 konnten nur relativ schwache Phosphorylierungen detektiert werden. Erk1 scheint damit sowohl auf der consensus CTD als auch auf der vorphosphorylierten pS2-CTD_[3] hauptsächlich Serin 5 zu phosphorylieren. Diese Ergebnisse unterstützen die vorher gezeigten Analysen der radioaktiven Kinaseassays und weisen für Erk2 die gleiche Spezifität auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Ein Nachweis der Phosphorylierungsstelle von Erk1 im Falle des vorphosphorylierten Substrates pS2-CTD durch Antikörper ist derzeit nicht möglich, da solche pS2-pS5 oder pS2-pS7-Doppelantikörper nicht verfügbar sind.

Eine andere Gruppe der Serin/Threonin MAP Kinasen sind die p38 Kinasen. Es sind beim Menschen vier paraloge Isoformen bekannt, die als p38- α (MAPK14), - β (MAPK11), - γ (MAPK12 oder ERK6) und - δ (MAPK13 oder SAPK4) bezeichnet werden. Sie sind in der MAPK Signalkaskade eingebunden und werden von der MKK Kinase aktiviert. Anders als bei Erk, die über Mitogene aktiviert wird und dies zu Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung führen kann, wird p38 bei zellulärem Stress, Tumornekrosefaktoren oder entzündungsfördernden Cytokinen, wie Interleukin-1-Rezeptor Typ 1, aktiviert, was Entzündungen, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung zur Folge haben kann (Keren et al., 2006; Mittelstadt et al., 2005). Es soll nun gezeigt werden, ob diese Kinasen ebenfalls Einfluss auf die CTD der RNAP II haben. Dazu wurde die Phosphorylierungsreaktion der CTD über die Zeit in einem Western Blot dargestellt (Abbildung 4.8 und 4.9).

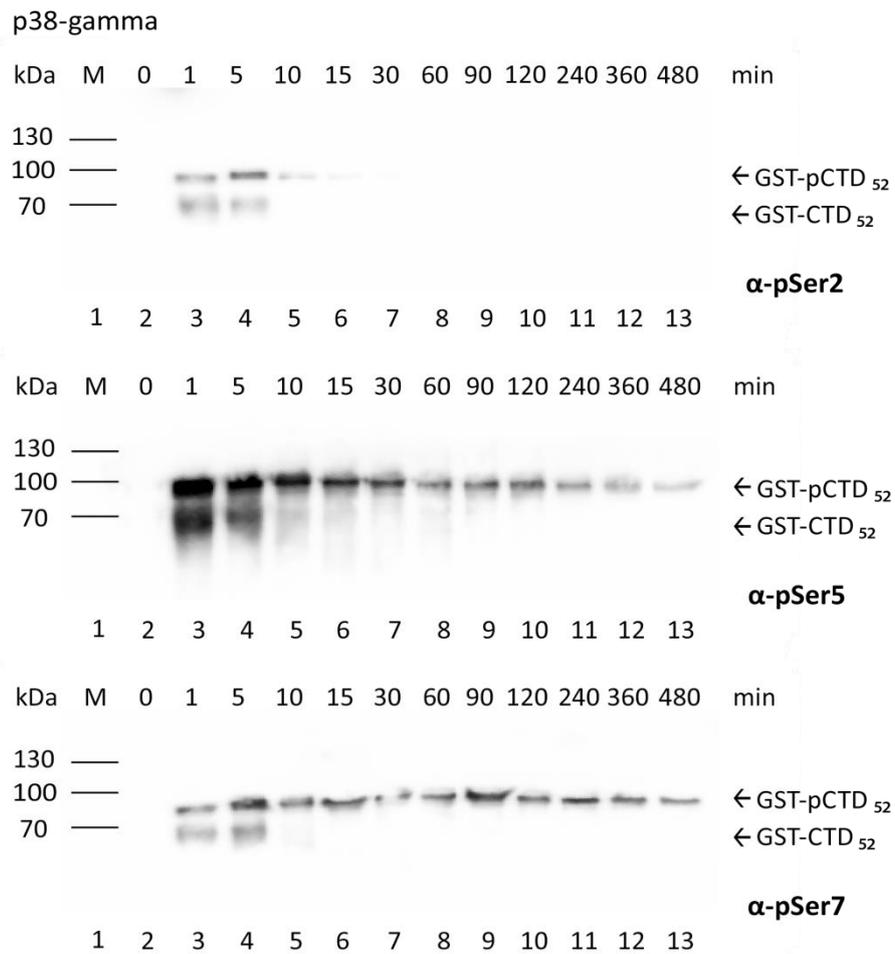


Abbildung 4.8: Western Blots der p38-gamma abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD_[52]
 Zeitabhängige Phosphorylierung von 10 μ M GST-CTD_[52] mit 0,2 μ M p38-gamma im Western Blot mit Antikörpern gegen pSer2, pSer5 und pSer7.

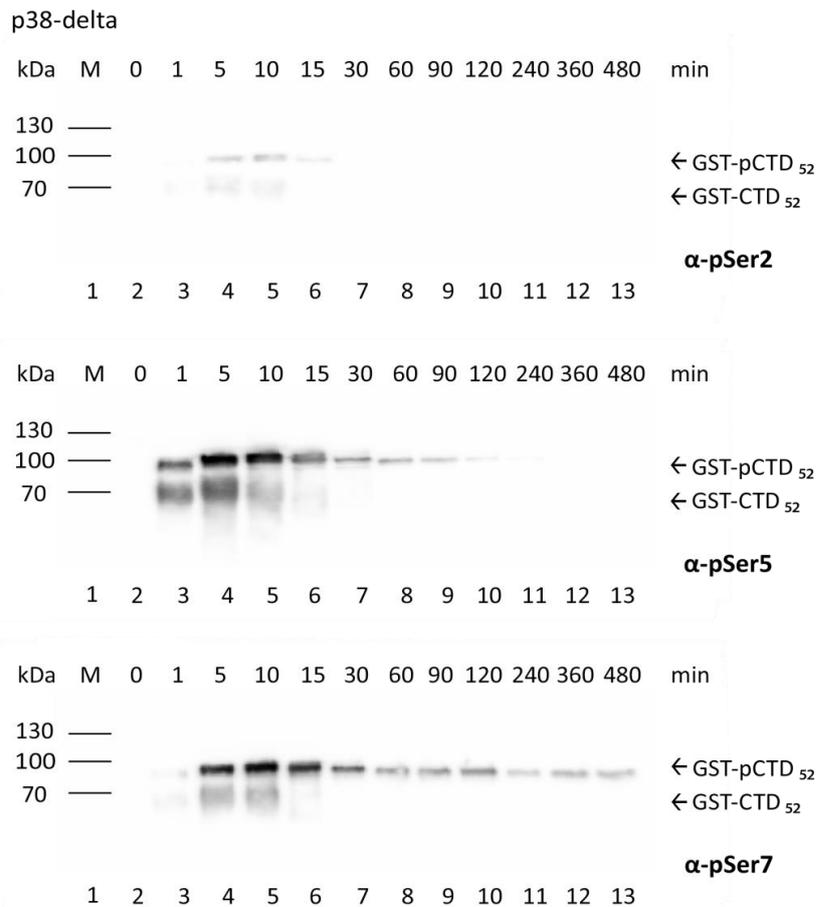


Abbildung 4.9: Western Blots der p38-delta abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD_[52]
 Zeitabhängige Phosphorylierung von 10 μ M GST-CTD_[52] mit 0,2 μ M p38-delta im Western Blot mit Antikörpern gegen pSer2, pSer5 und pSer7.

In den Western Blot-Analysen wurde untersucht, ob p38-delta und p38-gamma eine Phosphorylierungsübertragung auf die CTD der RNAP II zeigen (Abbildung 4.8 und 4.9). Dafür wurden wie zuvor 10 μ M GST-CTD Substrat mit 52 Heptawiederholungen in einer Reaktion mit 0,2 μ M der jeweiligen Kinase inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und im Western Blot mit CTD-Antikörpern gegen pSer2, pSer5 und pSer7 untersucht. Beide Kinasen können die CTD phosphorylieren und phosphorylieren dabei bevorzugt Serin 5. Es zeigte sich, dass beide Isoformen die gleiche Spezifität zeigen und eine sehr ähnliche Spezifität wie Erk1 aufweisen. Auffällig sind die leichten Phosphorylierungen an Ser2 und Ser7 nach wenigen Minuten, was auf eine Koexistenz der Phosphorylierungen hindeutet und auf eine geringe Spezifität der Kinasen. Die Abnahme der Phosphorylierung könnte durch eine zweifache Phosphorylierung innerhalb einer Wiederholung erklärt werden. Dadurch könnten die Antikörper ihr Epitop nicht mehr erkennen und die Bindung eventuell ausbleiben. Allerdings nimmt die Laufhöhe auch leicht ab, was auf eine Verunreinigung durch Phosphatase schließen lässt.

Als nächstes sollte ein Mechanismus für die Phosphorylierung der CTD durch Erk1 gezeigt werden.

4.1.3 Richtungsabhängigkeit der Phosphorylierungsreaktion von Erk

Studien von Herrn Dr. Christian Böskens zeigten, dass P-TEFb einer richtungsabhängigen Reaktion unterliegt und die Phosphorylierung effizienter auf einem Substrat abläuft, dass nur am C-Terminus vorphosphoryliert ist (Böskens, 2013). Es sollte nun auch für Erk1 nachgewiesen werden, ob die Reaktion Unterschiede relativ zu der Position der bereits vorhandenen Phosphorylierungen und damit möglicherweise auf eine Direktionalität schließen lässt. Hierzu wurden Peptide entworfen, die entweder nur am C- oder nur am N-Terminus eine Phosphorylierung beinhalteten. Die Messung erfolgte wieder in einem radioaktiven Kinaseassay mit 0,2 μM Kinase, 100 μM Substrat über 15 min und 30 °C (Abbildung 4.10).

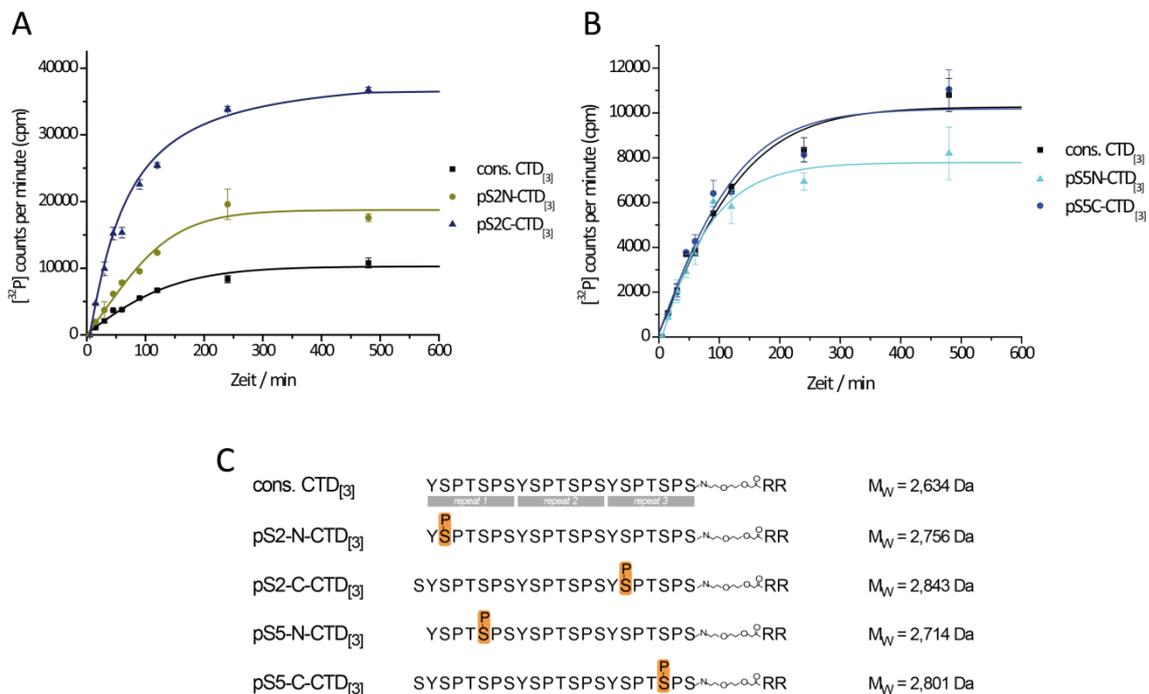


Abbildung 4.10: Erk1 Aktivität auf teilweise vorphosphorylierte CTD Substraten über die Zeit
Kinetische Analysen der Reaktionen mit 0,2 μM Erk1 auf 100 μM CTD_[3] Peptid auf (A) pS2 und (B) pS5 vorphosphorylierten Peptiden. C: Design der CTD Peptide mit jeweils einer Ser2 oder Ser5 Phosphorylierung in der N- oder C-terminalen Wiederholungssequenz.

Vorherige Ergebnisse weisen auf eine Serin 5 Phosphorylierung hin, welche durch eine Vorphosphorylierung an Position 2 verstärkt wird. Daher wurden sowohl Ser2 als auch Ser5 N- und C-terminal vorphosphorylierte Substrate verwendet (Abbildung 4.10 C). In Abbildung 4.10 A ist die Phosphorylierungsreaktion auf einem pS2N-CTD_[3] und einem pS2C-CTD_[3] Substrat im Vergleich zu der cons. CTD_[3] dargestellt. Deutlich erkennbar ist der schnellere Phosphatverbrauch auf dem pS2C-CTD_[3] Substrat. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ Wert liegt bei $3,72 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für pS2N-CTD_[3] bei $2,06 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die katalytische Aktivität von Erk auf einer C-terminal vorphosphorylierten CTD ist damit etwa zweimal höher als auf einer N-terminal vorphosphorylierten CTD. Da die vorherigen Ergebnisse auf eine Serin 5

Phosphorylierung durch Erk hindeuten, kann die Ser2 vorphosphorylierte CTD bis zu dreimal phosphoryliert werden.

Auch auf dem pS5C-CTD_[3] Substrat verläuft die Reaktion schneller als auf dem pS5N-CTD_[3] Substrat. Hier ist die katalytische Aktivität mit $1,06 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gleich der Aktivität auf der cons. CTD_[3]. Wenn man bei Erk von einer Serin 5 Kinase ausgeht, kann auf diesen Substraten nur eine zweifache Phosphorylierung vorgenommen werden, da eine Serin 5 Position schon besetzt ist. Dies weist für die cons. CTD_[3] daher ebenfalls nur 2 Phosphorylierungen in drei Wiederholungen auf. Der k_{cat}/K_m Wert für das pS2C-CTD_[3] Substrat wurde mit $0,847 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt und ist geringer als der Wert für pS2N-CTD_[3]. Diese Präferenz deutet auf eine Phosphorylierungsweiterleitung zum N-Terminus hin. Der Sättigungswert der pS5N-CTD_[3] liegt unterhalb des Wertes von pS5C-CTD_[3], was auf eine Ser2 Position der CTD hindeutet, die nicht von Erk phosphoryliert werden kann. So könnte die Kinase beispielsweise direkt neben der C-terminalen Phosphorylierung nur schlechter eine Phosphatgruppe übertragen, da die Erkennungsdomäne der Kinase für ein Phosphat, welches C-terminal von der nächsten Phosphorylierungsstelle positioniert ist, nur eine geringe Affinität hat.

Zusammenfassend deuten unsere Daten auf eine Phosphorylierung der CTD an Ser5 durch Erk1 und Erk2 hin. Dieses Ergebnis stimmt mit Studien anderer Labore überein (Bonnet et al., 1999; Trigon et al., 1998). Die erhöhte und schnellere Phosphorylierung durch Erk nach vorheriger Ser2 Phosphorylierung lässt eine Kombination der beiden Phosphorylierungen zu und lässt eine Präferenz von Erk für eine CTD erkennen, die schon an Ser2 durch eine andere Kinase vorphosphoryliert wurde. Bei diesem konsekutiven Mechanismus, bei dem die Kinase eine definiert vorhandene Phosphorylierung erkennt und bindet, bevorzugt Erk ein C-terminal vorphosphoryliertes Substrat. Diese Richtungsabhängigkeit der Phosphorylierungsreaktion hin zum N-terminalen Ende konnte durch einen radioaktiven Kinaseassay gezeigt werden. Die geringe Phosphorylierung an Ser2 und Ser7, die im Western Blot detektiert werden konnte, können auf eine unspezifische Modifikation oder ein Artefakt zurückzuführen sein. Da es keine übereinstimmenden Resultate über die Existenz einer Serin 2 Kinase gibt, die für Einleitung der Transkriptionstermination benötigt wird, wurden im nachfolgenden Abschnitt verschiedene Kinasen auf ihre Substratspezifität hin getestet.

4.2 Transkriptionsregulierende Kinasen

In Eukaryoten ist die Phosphorylierung eine der wichtigsten und häufigsten Modifikationen von Proteinen. Cdks spielen dabei eine zentrale Rolle und phosphorylieren zusammen mit ihrer regulatorischen Cyclin Untereinheit sowohl Serine als auch Threonine. Cdk7/CycH/MAT1 als Bestandteil des GTFs TFIIF und Cdk8/CycC als Teil des Mediator-komplexes spielen eine entscheidende Rolle während der Transkriptionsinitiation. In der Transkriptionselongation sind die Cdk-Cyclin-Paare Cdk9/CycT, Cdk12/CycK und

Cdk13/CycK von hoher Relevanz. Cdk12 und Cdk13 sind Homologe zu Ctk1 in Hefe und Cdk9 ist das Homolog zu Bur1 aus der Bäckerhefe. Cdk12 und Cdk13 sind mit 1490 und 1512 Aminosäuren ungewöhnlich große Kinasen, die 42 % Sequenzähnlichkeit aufweisen. Die Zuordnung der spezifischen Serin Phosphorylierungsstellen der CTD von Cdks bleibt jedoch unklar, weil unterschiedliche Präferenzen in verschiedenen Studien vorgeschlagen wurden (Bartkowiak and Greenleaf, 2011; Bartkowiak et al., 2010; Eick and Geyer, 2013).

Eines der am besten charakterisierten CAKs, Cdk7/p40^{MO15} bildet einen Komplex mit Cyclin H und phosphoryliert sowohl Cdks als auch die CTD der RNA-Polymerase II (Kaldis, 1999; Wallenfang and Seydoux, 2002). Cdk7 und Cyclin H sind Homologe von MCS6 und MCS2 (Damagnez et al., 1995). Eine dritte Untereinheit, die den Cyclin H/Cdk7 Komplex stabilisiert ist MAT1 (Devault et al., 1995; Tassan et al., 1995), ein Faktor, der im TFIIF Komplex von Säugetieren identifiziert worden ist (Serizawa et al., 1995; Shiekhattar et al., 1995). Das CAK aus Säugetieren ist Cdk7 und wird durch die Bindung mit Cyclin H aktiviert (Fisher and Morgan, 1994; Labbe et al., 1994; Makela et al., 1994). Cdk7 bevorzugt Ser5 Phosphorylierung der CTD *in vitro*, wie auch seine Orthologe aus den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* Kin28 und *Saccharomyces pombe* MCS6 (Eick and Geyer, 2013). Jedoch können Cdk7, MCS6 und Kin28 auch bei der Erzeugung der Ser7 Phosphorylierung in Verbindung gebracht werden. Zellstudien zeigen für Cdk8/CycC eine Übertragung des Phosphats sowohl auf Ser2 als auch auf Ser5 (Liao et al., 1995; Sun et al., 1998). Ebenso wurden für Cdk9/CycT1 Phosphorylierungen aller drei Serine an Position 2, 5 und 7 gefunden. Für Cdk12/CycK und Cdk13/CycK wurden Ser2 und Ser5 Phosphorylierungen beschrieben. In den nachfolgenden Abschnitten sollen diese und andere Kinasen näher untersucht werden. Eine Serin 7 Kinase – CdkF – wurde in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* gefunden und soll in *in vitro* Experimenten dargestellt und analysiert werden.

4.2.1 CdkF

Die Untersuchung der Kinaseaktivität von CdkF/CycH erforderte zunächst die Expression und Reinigung der aktiven Kinase. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, benötigen Cdks ihre regulatorische Cyclin-Untereinheit. Diese wurde für CdkF als CycH beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Heterokomplex aus CdkF und Cyclin H in den Grenzen 1-479 für CdkF und 1-336 für CycH generiert, die anhand von Sequenzvergleichen mit anderen Cdks für die Formierung eines aktiven Komplexes ausreichend sein sollten. CdkF wurde durch rekombinante Coexpression mit der Cdk-aktivierenden Kinase CAK1 aus *S. cerevisiae* in Baculo-Virus infizierten Insektenzellen und CycH in *E. coli* exprimiert. CdkF wurde N-terminal mit einem GST-Affinitätsanker und einer TEV-Protease Schnittstelle in den Akzeptorvektor pACEBac1 kloniert. CAK1 wurde in den Donorvektor pIDC kloniert und nach Fusionierung der Konstrukte per *in vitro*-Cre-LoxP-Reaktion in Baculoviren generiert und die beiden Proteine in *Sf9*-Insektenzellen überexprimiert. Die Komplexformierung mit CycH sollte durch eine Coreinigung erreicht werden. Die

Reinigung erfolgte über GST-Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie. Eine Bestimmung der für die Aktivität notwendigen Phosphorylierung erfolgte über ESI-MS und mittels Peptide Mass Fingerprint-Analyse (Abbildung 4.11).

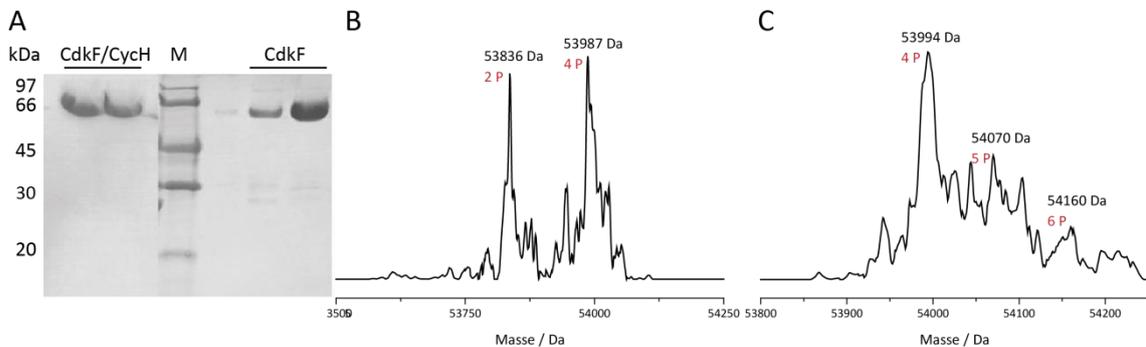


Abbildung 4.11: Proteincharakterisierung der gereinigten CdkF Kinase

A: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel von gereinigtem CdkF mit und ohne CycH. **B:** ESI-MS Spektrum von CdkF coexprimiert mit CAK1 und cogereinigt mit CycH. **C:** ESI-MS Spektrum von CdkF coexprimiert mit CAK1 zur Überprüfung der Phosphorylierung der Kinase.

Nach der Gelfiltration sollte die Komplexbildung zwischen CdkF und CycH und die Reinheit der Proteine mittels SDS-PAGE Analyse überprüft werden. In den Spuren 1 und 2 ist CdkF nach Coreinigung mit CycH dargestellt. Die Bande bei 55 kDa entspricht CdkF, weitere Banden durch Verunreinigungen sind nicht erkennbar. Allerdings fehlt auch eine Proteinbande für CycH, wie sie z.B. für Cdk9 und CycT1 zu beobachten ist, was darauf hindeutet, dass eine Komplexbildung mit CycH nicht stattgefunden hat (Abbildung 4.11 A). Das CycH hat somit nicht an CdkF gebunden, so dass CdkF die Cyclin-Untereinheit möglicherweise nicht braucht. In dem ersten Ansatz könnte CycH, trotz der fehlenden Bindung an CdkF, Einfluss auf die Struktur genommen haben oder in sehr geringen Mengen in der Proteinlösung vorkommen. Um dieser Fehlerquellen entgegenzuwirken, wurde eine neue Reinigungsstrategie verfolgt.

Die Aktivität von CdkF hängt nicht nur von der regulatorischen Untereinheit Cyclin H, sondern auch von der Phosphorylierung der Kinase im Aktivierungssegment ab. Da eine Cyclin Bindung anscheinend nicht benötigt wird, wurde CdkF mit CAK1 ohne Cyclin gereinigt. Mittels Coomassie-gefärbter SDS-PAGE konnte die Reinheit des Proteins überprüft werden (Abbildung 4.11 A). Die deutliche Bande bei 55 kDa entspricht der Masse von CdkF. Die Analyse per ESI-MS ergaben eine Masse von 53836 Da und 53987 Da für die CdkF Reinigung mit CycH. Diese Massen entsprechen einer zwei- bzw. vierfachen Phosphorylierung der Kinase (Abbildung 4.11 B). In Abbildung 4.11 C ist ein ESI-MS Spektrum von CdkF coexprimiert mit CAK1 dargestellt. Die detektierten Massen von 53.994 Da, 54.070 Da und 54.160 Da entsprechen Abweichungen von 316 Da, 392 Da und 482 Da was auf eine 4- bis 6-fache Modifikation durch Phosphorylierung zurückzuführen ist. In Peptide Mass Fingerprint-Analysen konnten Phosphorylierungen an Position Tyr205, Ser208 und Ser472 der Kinase gefunden werden (Ergebnisse nicht dargestellt) und somit eine Phosphorylierung der Kinase erreicht werden. Allerdings fehlte der Beweis für eine

Phosphorylierung im Aktivierungssegment an Position Threonin 290, da im Peptide Mass Fingerprint nicht alle Bereiche der Kinase dargestellt werden konnte. Die Aktivität sollte durch einen radioaktiven Kinaseassay und einen ESI-MS Assay auf verschiedenen Substraten nachgewiesen werden (Abbildung 4.12).

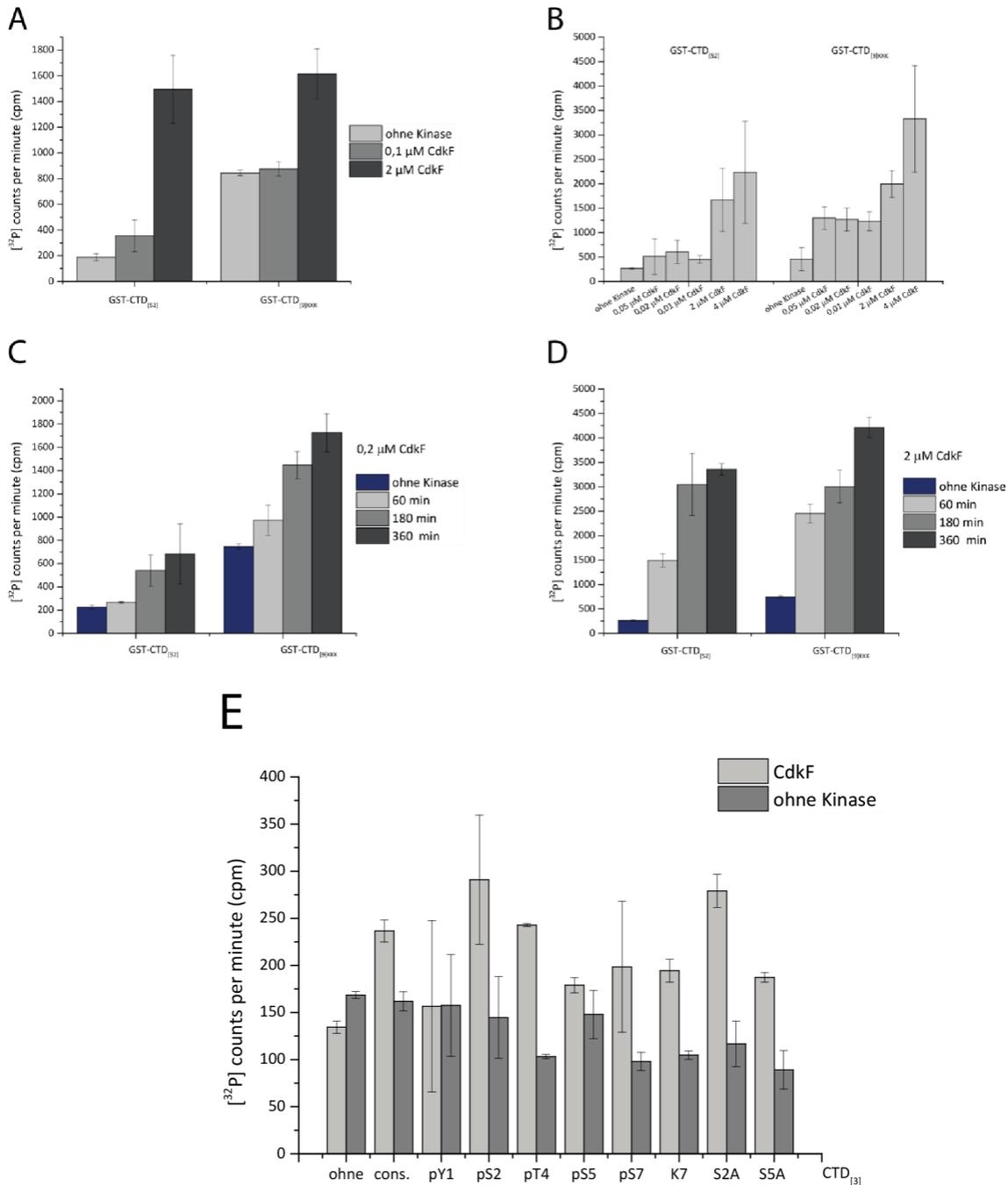


Abbildung 4.12: Charakterisierung der CdkF vermittelten Phosphorylierung der CTD

A: Radioaktiver Assay zur Bestimmung der Aktivität von CdkF anhand zwei verschiedener Kinasekonzentrationen und zwei verschiedener Substrate. **B:** Konzentrationsabhängiger, radioaktiver Kinaseassay. **C:** Zeitabhängige Phosphorylierung von 100 μM Substrat mit 0,2 μM CdkF. **D:** Zeitabhängige Phosphorylierung von 100 μM Substrat mit 2 μM CdkF zur Bestimmung des Zeitintervalls für weitere Analysen. **E:** Phosphorylierungsspezifität von 100 μM der vorphosphorylierten CTD-Peptide durch 0,2 μM CdkF.

Die Abbildung 4.12 A stellt die Überprüfung der Kinaseaktivität dar. Dazu wurden 0,1 μM und 2 μM CdkF auf 10 μM GST-CTD_[52] und 100 μM GST-CTD_{[9]KKK} über 30 min bei 30 °C inkubiert. Es konnte eine Phosphorylierung mit 2 μM CdkF sowohl auf dem verkürzten GST-CTD_{[9]KKK} als auch auf dem volllängen GST-CTD_[52] Substrat detektiert werden. Dabei scheint die Kinase für eine längere Wiederholungssequenz der CTD eine höhere Aktivität aufzuweisen, was möglicherweise mit einer höheren Affinität einhergehen könnte. Der Einsatz der Konzentration der aktiven Kinasen für weitere Studien wurde auf 1 μM bestimmt (Abbildung 4.12 B) und die Inkubationszeit auf 60 min (Abbildung 4.12 C und Abbildung 4.12 D). Die genaue Substratspezifität und eine eventuell benötigte Vorphosphorylierung sollte durch einen Assay mit radioaktiv-markiertem Co-Substrat ATP auf den Substratpeptiden mit 1 μM Kinase über 60 min bei 30 °C beschrieben werden (Abbildung 4.12 E). Als Negativkontrollen dienten jeweils die Ansätze ohne Kinase (dunkelgrau) und ein Ansatz ohne Substrat (erstes Balkenpaar). Die Zählraten sind allerdings sehr gering und zeigen für kein Peptid eine eindeutige Präferenz. Lediglich eine leichte Erhöhung auf einem pS2-CTD_[3] Substrat, pT4-CTD_[3] Substrat und auf einem S2A-CTD_[3] Substrat konnten verzeichnet werden. Aufgrund der geringen Aktivität der Kinase auf den Substratpeptiden konnte die Spezifität der Kinase nicht bestimmt werden. Eine sensitivere Methode zur Detektion von Phosphorylierungen ist der ESI-MS Assay, da er durch die Massenzunahme jede Phosphorylierung darstellen kann. Dazu wurden 100 μM Substrat, 1 μM CdkF, 2 mM ATP über 3 h bei 30 °C inkubiert und im ESI-MS analysiert (Abbildung 4.13). In allen ESI-MS Spektren sind die nicht beschrifteten Nebenpeaks auf Natriumaddukte zurückzuführen.

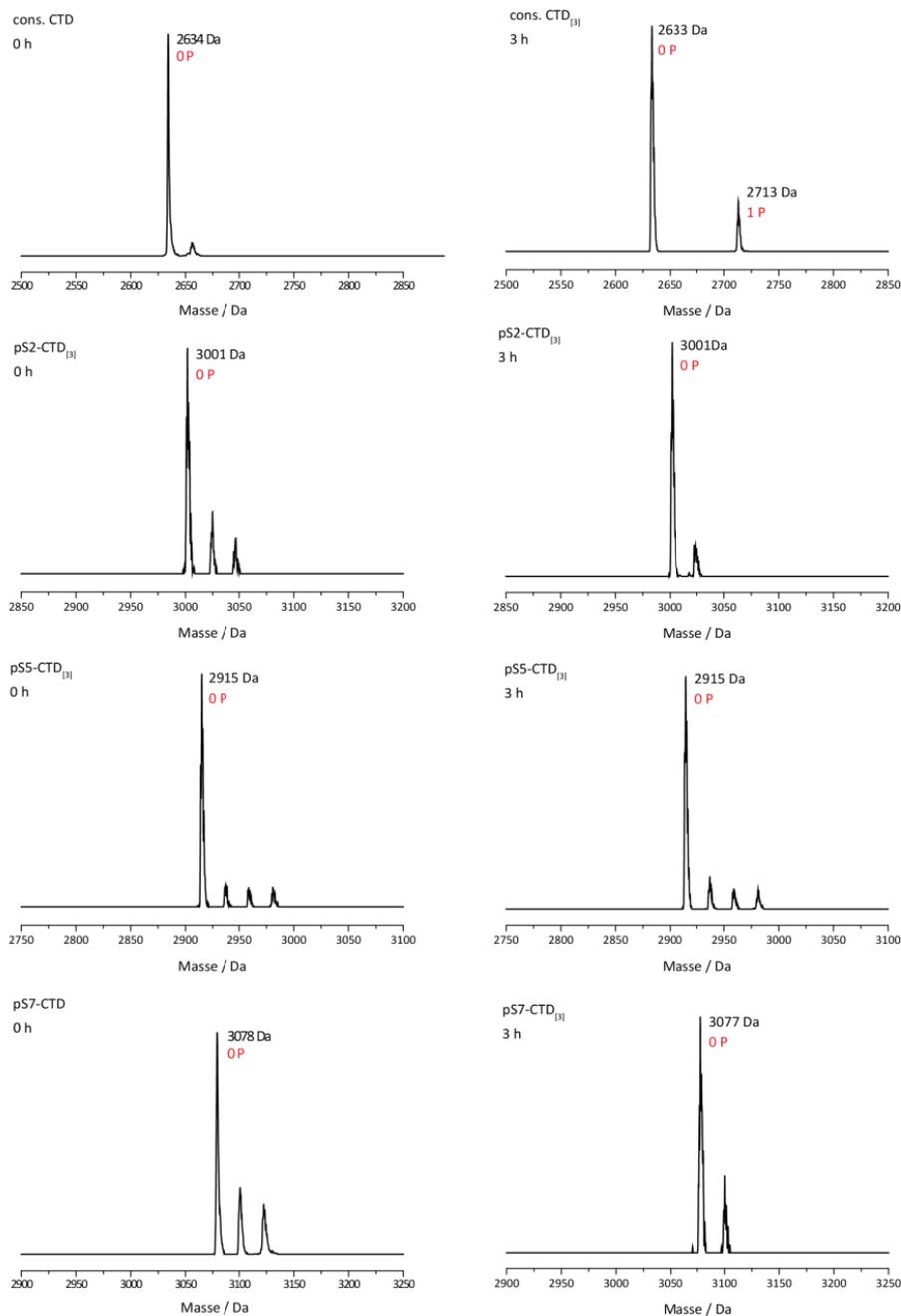


Abbildung 4.13: ESI-MS-Spektren der CTD-Peptide cons. CTD_[3], pS2-CTD_[3], pS5-CTD_[3], pS7-CTD_[3] vor und nach 3 stündiger Inkubation mit CdkF

100 μ M CTD-Peptide wurden mit 0,2 μ M CdkF und 2 mM ATP bei 30 °C für 3 h inkubiert und anschließend mittels ESI-MS analysiert. Ein mögliches Phosphorylierungsmuster konnte für keines der vier getesteten Substratpeptide gefunden werden, lediglich die cons. CTD_[3] zeigte eine Massenzunahme von einer Phosphorylierung nach 3 Stunden.

Bei der cons. CTD_[3] konnte eine Massenzunahme von 80 kDa beobachtet werden. Dies entspricht einer einfachen Phosphorylierung durch CdkF. Bei den vorphosphorylierten Peptiden an den Ser2, Ser5 und Ser7 Positionen konnten keine Massenzunahme bestimmt werden. Wahrscheinlich benötigt CdkF eine längere Sequenz zur Erkennung, was auch die geringeren Zählraten im radioaktiven Kinaseassay der GST-CTD_{[9]KKK} im Vergleich zu der

GST-CTD_[52] erklären würde. Die Position der Erkennungssequenz für die CTD könnte weiter vom aktiven Zentrum entfernt liegen. Ein weiteres Merkmal für diese Annahme stellt die nur einfache Phosphorylierung der cons. CTD_[3] dar. Auch hier könnten für eine weitere Phosphorylierung die Länge der drei Wiederholungen der CTD Peptide zu kurz für eine Substratbindung und Phosphorylierung sein. Zudem könnte auch eine Vorphosphorylierung für die Aktivität von CdkF nicht benötigt werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Spezifität von CdkF wurden Western Blot Analysen durchgeführt, die Aufschluss über die Position der Phosphorylierung auf der CTD durch CdkF geben sollte. In diesem experimentellen Ansatz wurden 10 μ M GST-CTD_[52] mit 1 μ M CdkF und 2 mM ATP versetzt, bei 30 °C inkubiert und die Reaktion zu den unten genannten Zeiten mit EDTA gestoppt (Abbildung 4.14). Zur Detektion der Phosphorylierungen auf der CTD wurden die spezifischen Antikörper gegen pSer2 (3E10), pSer5 (3E8) und pSer7 (4E12) eingesetzt und mittels LAS-3000 intelligent Dark Box von Fujifilm detektiert.

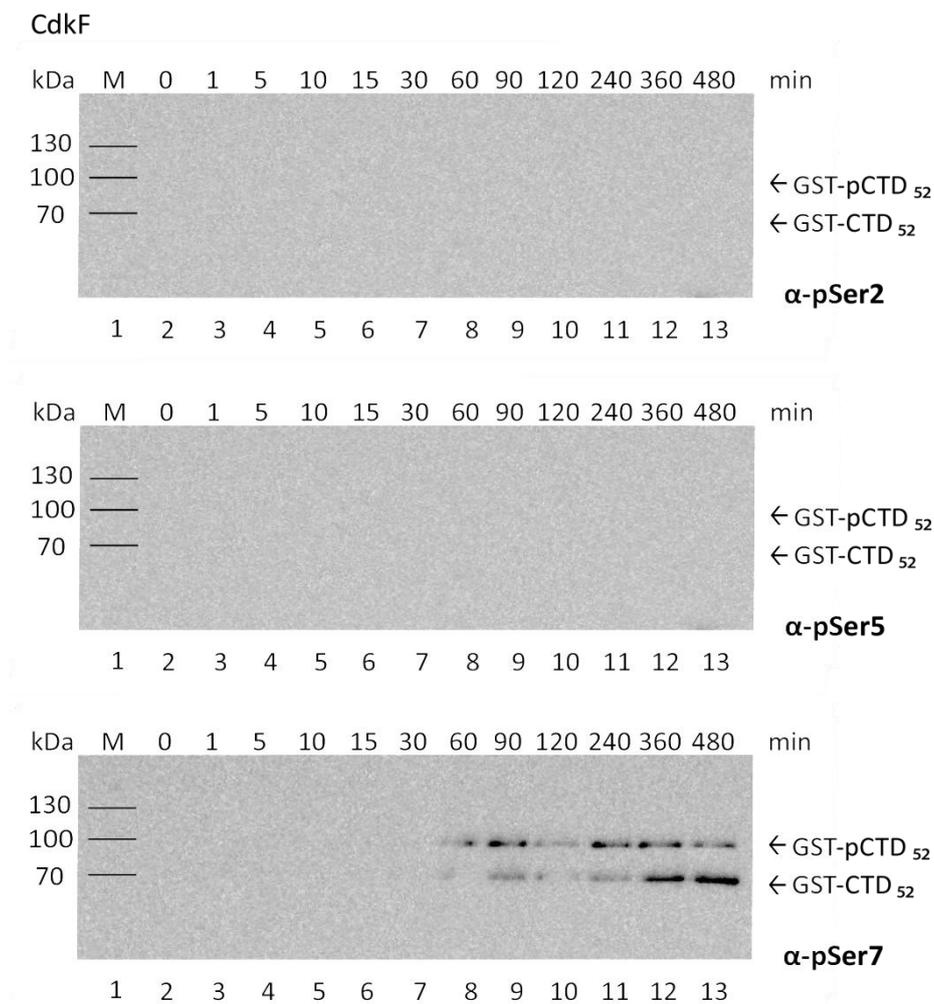


Abbildung 4.14: Western Blots der CdkF abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD_[52]
Zeitabhängige Phosphorylierung von 10 μ M GST-CTD_[52] mit 0,2 μ M CdkF im Western Blot mit Antikörpern gegen pSer2, pSer5 und pSer7.

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass CdkF eine starke Präferenz für Ser7-Phosphorylierung aufweist. Für eine Ser2 und Ser5 Phosphorylierung zeigten die Antikörper gar keine Reaktivität. Auffällig war, dass die Zwischenstufen der CTD von der hypophosphorylierten I_a Form zur hyperphosphorylierten I_o Form ausblieben. Zudem fand eine Phosphorylierung erst nach einer Stunde statt, was für eine geringe Aktivität von CdkF spricht. Die alleinige Serin 7 Detektion zeigt eine hohe Spezifität der CdkF Kinase für die CTD. Bei vielen anderen Kinasen können immer unspezifische Phosphorylierungen oder Artefakte detektiert werden. In der Literatur gibt es Anhaltspunkte für eine Steigerung der Kinaseaktivität durch Mangan (Devaiah et al., 2012), jedoch blieb eine Erhöhung durch die Zugabe von Mangan aus (Daten nicht gezeigt).

Da CdkF anscheinend eine sehr hohe Spezifität für Serin 7 hat, kann die Kinase verwendet werden um beispielsweise für Cdk9/CycT1 eine Vorphosphorylierung auf einer GST-CTD_[52] durchzuführen, um anschließend den Einfluss dieser Phosphorylierung auf die schnellere Phosphorylierungsreaktion von beispielsweise Cdk9/CycT1 oder Cdk13/CycK zu untersuchen. Anhand von kurzen Substratpeptiden wurde schon eine erhöhte Aktivität von Cdk12/CycK und Cdk9/CycT1 auf ein pS7-CTD_[3] Substrat beschrieben (Bösken et al., 2014). Neben CdkF sollten auch andere Kinasen bezüglich ihrer Fähigkeit, die RNAP II CTD zu phosphorylieren, getestet werden. Hierzu wurden Spleißkinasen, die ihre Aktivität auf Proteinen mit RS-Domänen haben, analysiert.

4.2.2 Dsk1 und SRPK2

Die humanen Enzyme Dsk1 und SRPK2 sind Spleißkinasen, die spezifisch SR-Proteine, wie das SRSFII Protein phosphorylieren (Aubol et al., 2013). Aufgrund ihrer Bedeutung während des pre-mRNA Spleißens, sollten die Kinasen auf ihre Fähigkeit, die RNAP II CTD zu phosphorylieren, getestet werden. Der Spleißprozess ist mit der Transkription eng verbunden und steht möglicherweise in einem Zusammenhang mit den CTD Modifizierungen. Der C-Terminus des SRSFII Proteins beinhaltet eine RS2-Domäne, die ein spezifisches Serin-Prolin reiches Motiv aufweist. Der RS2-Domäne enthält die Aminosäuresequenz [YSPR], ähnlich dem consensus Heptapeptid der CTD. Daher wurde vermutet, dass die Spleißkinasen auch das YSPTSPS-Motiv der CTD erkennen und dieses an Serin 2 phosphorylieren.

Um diese Annahme zu testen, wurde zunächst das SRSFII Protein in *E. coli* exprimiert und über GST-Affinitätschromatographie mit anschließender Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Kinasen wurden von Prof. Kevan Shokat der University of California at San Francisco (UCSF) in Zusammenarbeit mit Jesse Lipp bereitgestellt. Die Aktivität der Kinasen wurde über einen radioaktiven Kinaseassay mit 0,2 µM Spleißkinase, 100 µM GST-CTD_{[9]KKK} oder 10 µM GST-CTD_[52] und 2 mM ATP über 30 min bei 30 °C bestimmt. Als positive Kontrolle dienten 100 µM des Substrats GST-SRSFII. Zusätzlich wurde auch die P-TEFb Aktivität auf dem GST-SRSFII Substrat getestet. Als

Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Substrat durchgeführt (Abbildung 4.15 A). Die Analyse der Phosphorylierungsstellen sollte durch die Substratpeptide erfolgen (Abbildung 4.15 B und C).

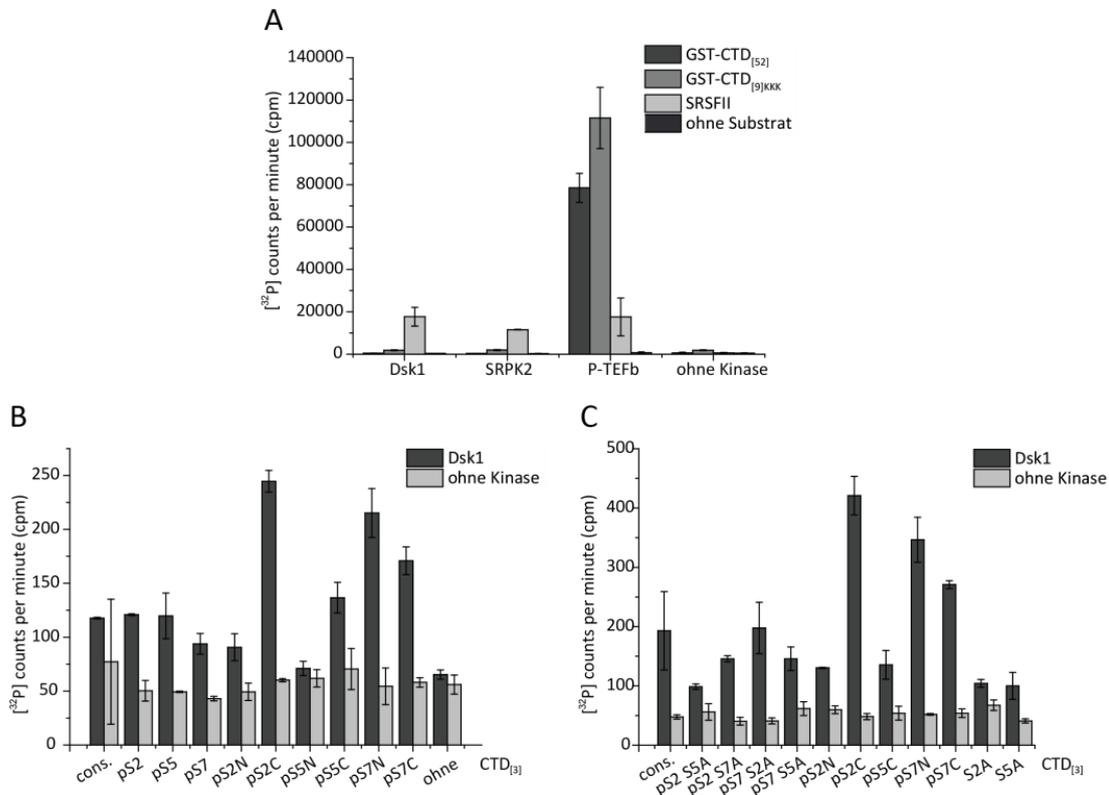


Abbildung 4.15: Charakterisierung der Dsk1 und SRPK2 vermittelten Phosphorylierung der CTD und der P-TEFb vermittelten Phosphorylierung des SRSFII Proteins

A: Radioaktiven Kinaseassay zur Bestimmung der Aktivität von Dsk1 und SRPK2 auf die CTD und Bestimmung der Aktivität von P-TEFb auf ein GST-SRSFII Substrat. **B:** Phosphorylierungsspezifität von 100 μ M der vorphosphorylierten CTD-Peptide durch 0,2 μ M Dsk1. **C:** Phosphorylierungsspezifität von 100 μ M der vorphosphorylierten CTD-Peptide durch 0,2 μ M Dsk1.

In Abbildung 4.15 A ist die Aktivität der drei Kinasen Dsk1, SRPK2 und P-TEFb mit den beiden Substratproteinen CTD und SRSFII dargestellt. Dsk1 und SRPK2 phosphorylieren als Positivkontrolle das SRSFII Protein. Die CTD hingegen wird von den Kinasen nur sehr gering phosphoryliert. P-TEFb diente als Positivkontrolle und zeigt eine starke Aktivität auf der CTD. Zudem ist eine Phosphorylierung des SRSFII Proteins durch P-TEFb zu erkennen.

Die geringe Phosphorylierung der CTD durch die Spleißkinasen sollte nun durch einen Assay mit kurzen Substratpeptiden weiter untersucht werden und die Position der Phosphorylierung auf der CTD bestimmt werden. In einem radioaktiven Kinaseassay wurden 0,2 μ M Dsk1, 100 μ M Substrat und 2 mM ATP über 30 min bei 30 °C verwendet (Abbildung 4.15 B und C). Als Negativkontrollen dienten jeweils die Ansätze ohne Kinase (hellgraue Balken). Die Zählraten sind sehr gering und zeigen für kein Peptid eine eindeutige Präferenz. Der höchste Ausschlag konnte für die Substratpeptide pS2C-CTD_[3]

Substrat, pS7C-CTD_[3] Substrat und pS7N-CTD_[3] beobachtet werden. Es konnte jedoch keine Spezifität der Kinase bestimmt werden. Um weitere Analysen zu der Substratspezifität vorzunehmen, wurden andere Peptide verwendet, die keine Phosphorylierungsoption an Ser2 oder Ser5 aufwiesen (Abbildung 4.15 C). Allerdings blieb auch hier die Klärung der Phosphorylierungsstelle aus. Eine genauere Untersuchung sollte durch einen Western Blot-Assay auf der GST-CTD_[52] erreicht werden (Abbildung 4.16).

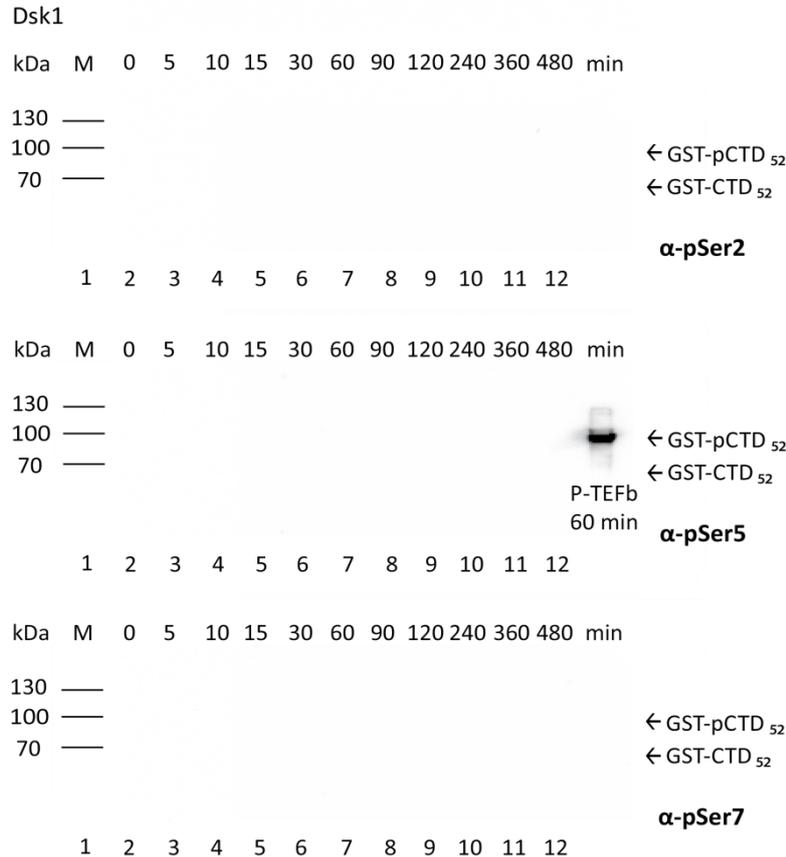


Abbildung 4.16: Western Blots der Dsk1 abhängigen Phosphorylierung der GST-CTD_[52]
Zeitabhängige Phosphorylierung von 10 μ M GST-CTD_[52] mit 0,2 μ M Dsk1 oder SRPK2 im Western Blot mit Antikörpern gegen pSer2, pSer5 und pSer7.

Als Positivkontrolle wurde auf den Western Blot gegen die Serin 5 Phosphorylierung die GST-CTD_[52] nach 60-minütiger Phosphorylierung durch P-TEFb aufgetragen und zeigt eine Phosphorylierung der Serin 5 Position. Dsk1 zeigte keine Reaktivität der unphosphorylierten GST.CTD_[52]. Die Kinase konnte somit für eine Phosphorylierung von Ser2, Ser5 und Ser7 auf einer unphosphorylierten CTD ausgeschlossen werden. Auch für die SRPK2 Kinase konnte keine Aktivität auf der GST-CTD_[52] detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Fraglich ist jedoch noch, ob die Kinasen auf einer vorphosphorylierten CTD mit 52 Wiederholungen eine Aktivität zeigen würden. Dieses Experiment konnte *in vitro* nicht durchgeführt werden, da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Kinase bekannt ist, die ganz spezifisch nur eine Ser2 oder Ser5 Phosphorylierung auf der CTD durchführt und keine Hintergrundaktivität auch für eine andere Phosphorylierung zeigt.

4.3 Funktionelle Untersuchungen der Regulation von P-TEFb durch Cofaktoren

In der Regulation der Aktivität von P-TEFb – und somit auch der Transkriptionselongation – spielt die von zellulären Cofaktoren vermittelte Überführung des P-TEFb Komplexes vom inaktiven in den aktiven Zustand eine zentrale Rolle. Das HIV-1 Tat-Protein hebt die Inhibition von P-TEFb durch Verdrängung von Hexim1 und Bindung an die TAR RNA am viralen Promotor auf (Barboric et al., 2007; Fraldi et al., 2005; Schulte et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass Brd4 mittels seiner C-terminalen Domäne PID (engl.: *P-TEFb interacting domain*) P-TEFb aktiviert und über N-terminal-gelegene Bromodomänen an acetylierte Histone in aktiv-transkribierten Gene rekrutiert (Bisgrove et al., 2007; Dey et al., 2003; Vollmuth and Geyer, 2010). Das Protein AFF4 bindet als Untereinheit des SEC an P-TEFb und aktiviert über MLL-Proteine die Expression spezifischer Gene (Biswas et al., 2011; He et al., 2010; Lin et al., 2010). Ob die Cofaktoren dabei nur eine aktivierende Funktion haben oder durch Veränderung der Interaktionsoberfläche auch einen Einfluss auf die Substratspezifität nehmen, konnte bisher im Detail nicht geklärt werden. Eine Veränderung der Substratspezifität von P-TEFb in Form einer Erweiterung von Ser2 auf Ser2/Ser5-Doppelphosphorylierungen ist für HIV-1 Tat beschrieben (Zhou et al., 2000), konnte jedoch in Arbeiten von Frau Dr. Friederike Itzen für die P-TEFb Aktivierung mittels Brd4 (Vollmuth, 2010) oder AFF4 (unveröffentlichte Daten, Itzen und Greifenberg) nicht beobachtet werden. Vor dem Hintergrund unserer bisherigen Ergebnisse sollte die Veränderung der Substratspezifität durch Tat neu analysiert werden. Darüber hinaus wurde für alle drei Cofaktoren eine Veränderung der Substratspezifität bei vorhandenen Vorphosphorylierungen der CTD untersucht.

4.3.1 Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 PID

In früheren Studien wurde die Interaktion von Brd4 mit acetylierten Histonen H3 und H4 beschrieben (Dey et al., 2003). Eine spätere Studie zeigte die Interaktion der C-terminalen Domäne von Brd4 mit P-TEFb (Vollmuth et al., 2009). Dabei bindet die C-terminale Domäne an acetylierte Lysine in der CycT1 Untereinheit von P-TEFb (Filippakopoulos et al., 2010). Um den Einfluss verschiedener Brd4 Domänen auf P-TEFb genauer zu untersuchen, wurden fünf verschiedene Brd4 Konstrukte entworfen und auf ihr Fähigkeit hin P-TEFb zu aktivieren getestet.

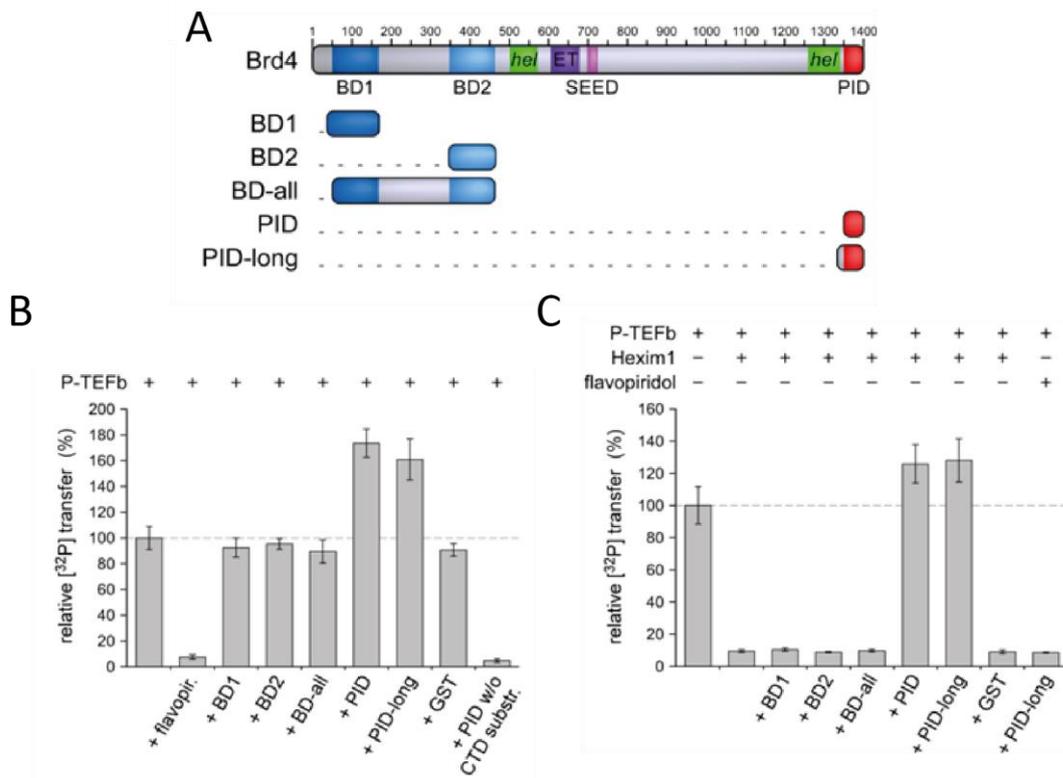


Abbildung 4.17: Domänen-Design der verwendeten Brd4 Konstrukte und Analyse dieser Regionen auf die P-TEFb Aktivität

A: Design der verschiedenen Brd4 Konstrukte. **B:** Radioaktiver Kinaseassay zur Stimulierung von P-TEFb durch verschiedene Brd4 Konstrukte. **C:** Radioaktiver Kinaseassay zur Bestimmung des Einflusses der Konstrukte auf die Hxm vermittelte P-TEFb Inhibition.

In Abbildung 4.17 A sind verschiedene Konstrukte von Brd4 dargestellt, die in Zusammenarbeit mit Dr. Friederike Itzen für die Expression in *E. coli* und Reinigung mittels GST-Affinitätstag entworfen wurden. Die N- (BD1) und C-terminale (BD2) Bromodomäne wurde jeweils einzeln und als auch zusammen (BD-all) generiert. BD-all setzt sich aus den beiden Bromodomänen BD1 und BD2 und dem intermediären Linker als Verbindungsstück zusammen. Zusätzliche wurden zwei C-terminale Regionen (PID und PID-long) gewählt. Da die PID keine natürlichen aromatischen Aminosäuren am C-Terminus aufweist, wurde für eine bessere Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung noch PID-long entworfen, die ein zusätzliches Tryptophan enthält.

Im Anschluss sollte der Einfluss der verschiedenen Domänen auf die P-TEFb Aktivität und auf die Hexim1-inhibierte P-TEFb Aktivität quantifiziert werden. Hexim1 in den Grenzen 200-359 zeigte eine maximale Inhibition von P-TEFb und besitzt die gleiche inhibitorische Wirkung wie ungekürztes Hexim1 im Komplex mit der 7SK snRNA. Dieses konnte in weiteren Analysen in dieser Arbeit verwendet werden (Czudnochowski et al., 2012). In einem [γ -³²P]-markierten Assay wurden 0,2 μ M P-TEFb als Kinase, 100 μ M GST-CTD_{[9]K_{KK}}, 2 μ M Hexim1, 10 μ M Brd4 Konstrukte und 2 mM ATP verwendet. Als

Negativkontrolle diente der P-TEFb Inhibitor Flavopiridol, der durch die Besetzung der ATP Bindetasche die Phosphatübertragung verhindert (Baumli et al., 2008). Als weitere Kontrolle diente die Zugabe von GST, da ausgeschlossen werden sollte, dass das GST der verwendeten GST-Fusionskonstrukte eine Auswirkung auf die Kinaseaktivität von P-TEFb hat. Als Richtwert diente jeweils der P-TEFb vermittelte [γ - 32 P] Einbau von ATP nach 15 min bei 30 °C in die CTD. Dieser Wert wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ zu diesem errechnet. Wie aus Abbildung 4.22 B erkennbar ist, konnte keine Änderung der P-TEFb Aktivität nach Zugabe von BD1, BD2, BD-all oder GST beobachtet werden. Im Gegensatz zu einer Zugabe der C-terminalen Domänen PID und PID-long, bei der eine Stimulation um das 1,74-fache bzw. 1,61-fache zu verzeichnen ist. Eine weitere Kontrolle stellte das Fehlen des Substrats CTD bei gleichzeitiger Anwesenheit von Brd4 PID dar, wodurch eine Phosphorylierung der PID selbst ausgeschlossen werden konnte. In einer zweiten Experimentserie konnte die Hexim1 vermittelte Inhibition durch PID und PID-long aufgehoben werden (Abbildung 4.17 C). Zudem wurde auch hier ein leicht stimulierender Effekt beobachtet, bei dem trotz Inhibition durch Hexim1 die P-TEFb Aktivität durch PID um das 1,3-fache erhöht wird. Eine Änderung bei Zugabe der Bromodomänen BD1, BD1 oder BD-all konnte hingegen nicht beobachtet werden. Ebenso konnte eine Wiederherstellung der P-TEFb Aktivität nach Flavopiridol Inhibition auch durch PID nicht gezeigt werden.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass Brd4 PID ein Cofaktor von P-TEFb ist, der die Phosphorylierung der CTD durch P-TEFb stimuliert. Zudem konnte die inhibitorische Wirkung von Hexim1 durch die PID aufgehoben werden und stellt den aktivierenden Teil in Brd4 für P-TEFb dar. Zudem scheint der Mechanismus der Aktivierung durch Brd4 anders bei Hexim1 als bei Flavopiridol zu sein. In Zeitverläufen der Kinasereaktion in Anwesenheit der PID sollte nun der stimulierende Effekt der Brd4 PID in Zusammenarbeit mit Dr. Friederike Itzen näher beschrieben werden (Abbildung 4.18).

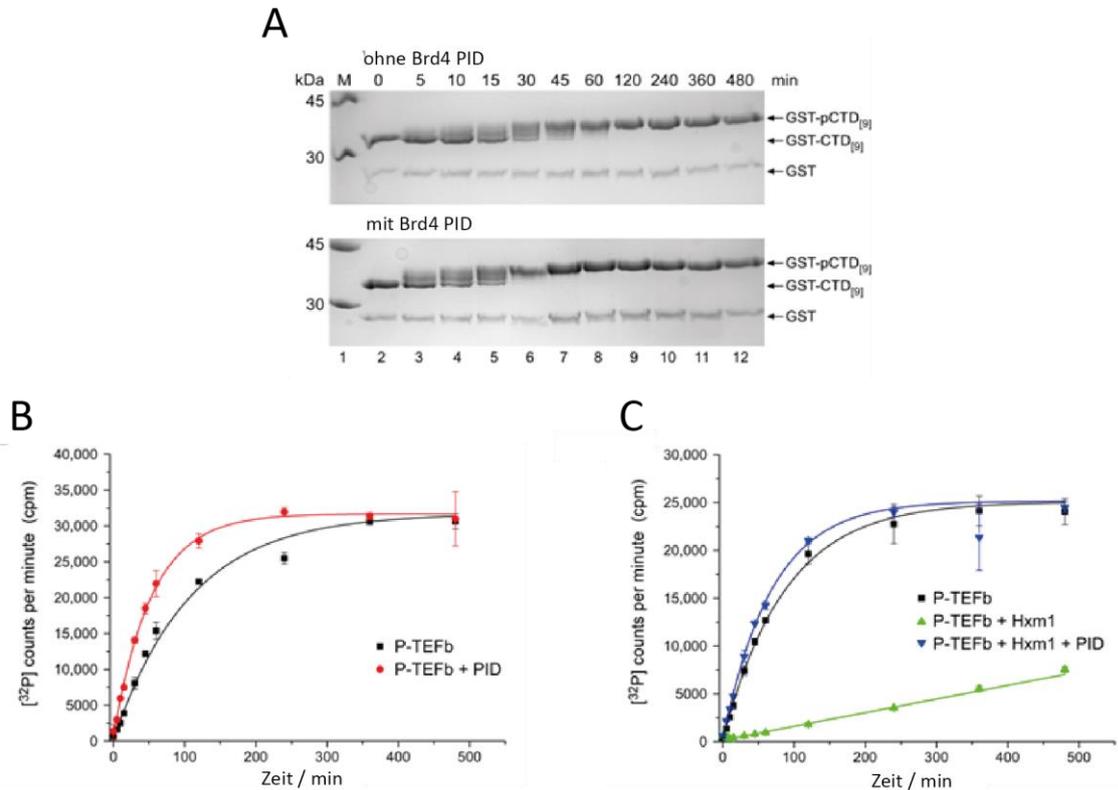


Abbildung 4.18: Kinetiken der Brd4 PID stimulierenden P-TEFb Aktivität

A: SDS-PAGE Analyse der P-TEFb vermittelten GST-CTD_[52] Phosphorylierung mit und ohne Brd4 PID. **B:** Kinetische Analyse der P-TEFb Reaktion auf GST-CTD_{[9]KKK} in Abwesenheit von Hexim1. **C:** Kinetische Analyse der P-TEFb Reaktion auf GST-CTD_{[9]KKK} in Anwesenheit von Hexim1.

In den in Abbildung 4.18 gezeigten Zeitverläufen konnte eine höhere Aktivität der Kinase in Gegenwart von PID festgestellt werden. In der SDS-PAGE Analyse konnte eine schnellere Verschiebung der GST-CTD_[52] in die I₁₀-Form mit Brd4 PID beobachtet werden. Nach 30-45 Minuten ist hier eine vollständige Verschiebung zu erkennen, ohne jedoch Brd4 PID erst nach 60-90 Minuten. Die zusätzliche Bande bei 27 kDa ist auf eine leichte GST Verunreinigung zurückzuführen. Die quantitativen Assays in Abbildung 4.18 B und C stellen die Kinetik der Reaktion dar. Ohne PID wurde ein k_{cat}/K_m Wert von $0,77 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt und in Gegenwart von PID $1,55 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dies entspricht einer 2-fach erhöhten kinetischen Aktivität von P-TEFb durch Brd4 PID. Das Ende der Kinasereaktion ist in beiden Fällen jedoch gleich hoch, was mit einer gleichen Anzahl an Phosphatgruppenübertragung einhergeht. Damit ist die maximale Anzahl der gesetzten Phosphorylierungen bei beiden Reaktionen die gleiche.

Als nächstes wurde untersucht, ob PID eine stimulatorische Wirkung auch in Gegenwart von Hexim1 entfalten kann. Eine leichte, basale Kinaseaktivität konnte für P-TEFb mit Hexim beobachtet werden. In Anwesenheit der PID konnten für P-TEFb ohne Hexim1 ein k_{cat}/K_m Wert von $0,94 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für P-TEFb mit PID ein Wert von $1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Auch hier ist die Amplitude für die CTD Phosphorylierungsreaktion nicht verschoben. Es konnte weder eine PID-induzierte Änderung im Migrationsverhalten der CTD beobachtet werden, noch eine "Erweiterung" der Kinaseaktivität zu höheren

Phosphorylierungszuständen. Der Effekt von Brd4 PID auf P-TEFb setzt die Interaktion der Proteine voraus. Da P-TEFb bekanntlich aus zwei Untereinheiten besteht, sollte durch Isothermale Titrationskalorimetrie der Bindungspartner von Brd4 PID bestimmt werden. Diese Messungen wurden von Friederike Itzen durchgeführt (Abbildung 4.19).

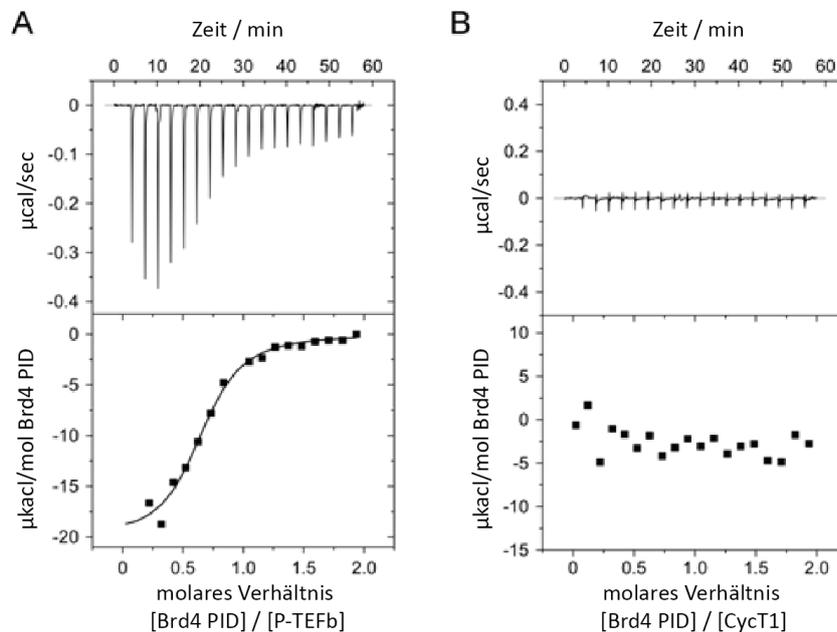


Abbildung 4.19: ITC Messungen zur Charakterisierung der Bindung von Brd4 PID an P-TEFb

A: ITC Titration von 100 μM Brd4 PID gegen 10 μM P-TEFb. **B:** ITC Messung von 100 μM Brd4 PID gegen 10 μM CycT1.

Die Titration von Brd4 PID zu P-TEFb ergab eine Dissoziationskonstante von $0,5 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$. Die Änderung der Enthalpie wurde auf $-20,1 \pm 1,2$ ermittelt, die eine exotherme Reaktion anzeigt. Die Stöchiometrie von $0,65 \pm 0,03$ weist auf eine Bindung von zwei Brd4 PID Molekülen an ein P-TEFb Molekül hin. Allerdings könnte eine Präzipitation von P-TEFb vorliegen und somit eine geringere Konzentration, was die Messung der Stöchiometrie verfälschen würde. Um die bindende Untereinheit von P-TEFb weiter einzugrenzen, wurde Brd4 PID nur zu CycT1 titriert. Es konnte jedoch keine Bindung der beiden Proteine ermittelt werden. Das Fehlen dieser Interaktion legt eine Bindung von Brd4 PID an die Cdk9 Untereinheit nahe. Allerdings konnte die Untereinheit Cdk9 alleine nicht aktiv und stabil gereinigt werden, weshalb eine Interaktionsstudie von Cdk9 zu Brd4 PID nicht möglich war. Trotzdem ist davon auszugehen, dass Brd4 an Cdk9 und nicht an CycT1 bindet. Dieses Resultat entspricht einem anderem Mechanismus im Vergleich zu dem Transaktivator Tat. Tat bindet an die CycT1 Untereinheit von P-TEFb und verdrängt so Hexim1 von CycT1 (Barboric et al., 2007; Schulte et al., 2005). Allerdings wurden Studien veröffentlicht, bei denen eine Bindung von Brd4 PID sowohl an CycT1 als auch an Cdk9 nachgewiesen wurden (Bisgrove et al., 2007). Da einige Sequenzmotive in Brd4 an das HIV Protein Tat erinnern, werden im nächsten Abschnitt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Proteine dargestellt, ebenso wie die Bedeutung der Sequenzmotive analysiert.

4.3.2 Vergleichende Analyse zum Einfluss von Brd4 und HIV-1 Tat auf P-TEFb

Das HIV-1 Tat Protein aktiviert genau wie Brd4 die Kinaseaktivität von P-TEFb und kann ebenfalls eine Inhibition durch Hexim1 aufheben. Dies legt einen ähnlichen Mechanismus der beiden Proteine nahe. Tat rekrutiert zusammen mit TAR (engl.: *transcription activating response element*) P-TEFb zur RNAP II, um die Transkriptionselongation viraler Gene zu aktivieren (Wei et al., 1998). Dabei verdrängt Tat/TAR Hexim1 von der ersten Cyclinbox von CycT1 (Anand et al., 2008; Michels et al., 2003; Schulte et al., 2005). Während der Analysen von Brd4 fanden wir Übereinstimmungen in der Anordnung regulatorischer Motive zu der Sequenz von Tat (Abbildung 4.20).

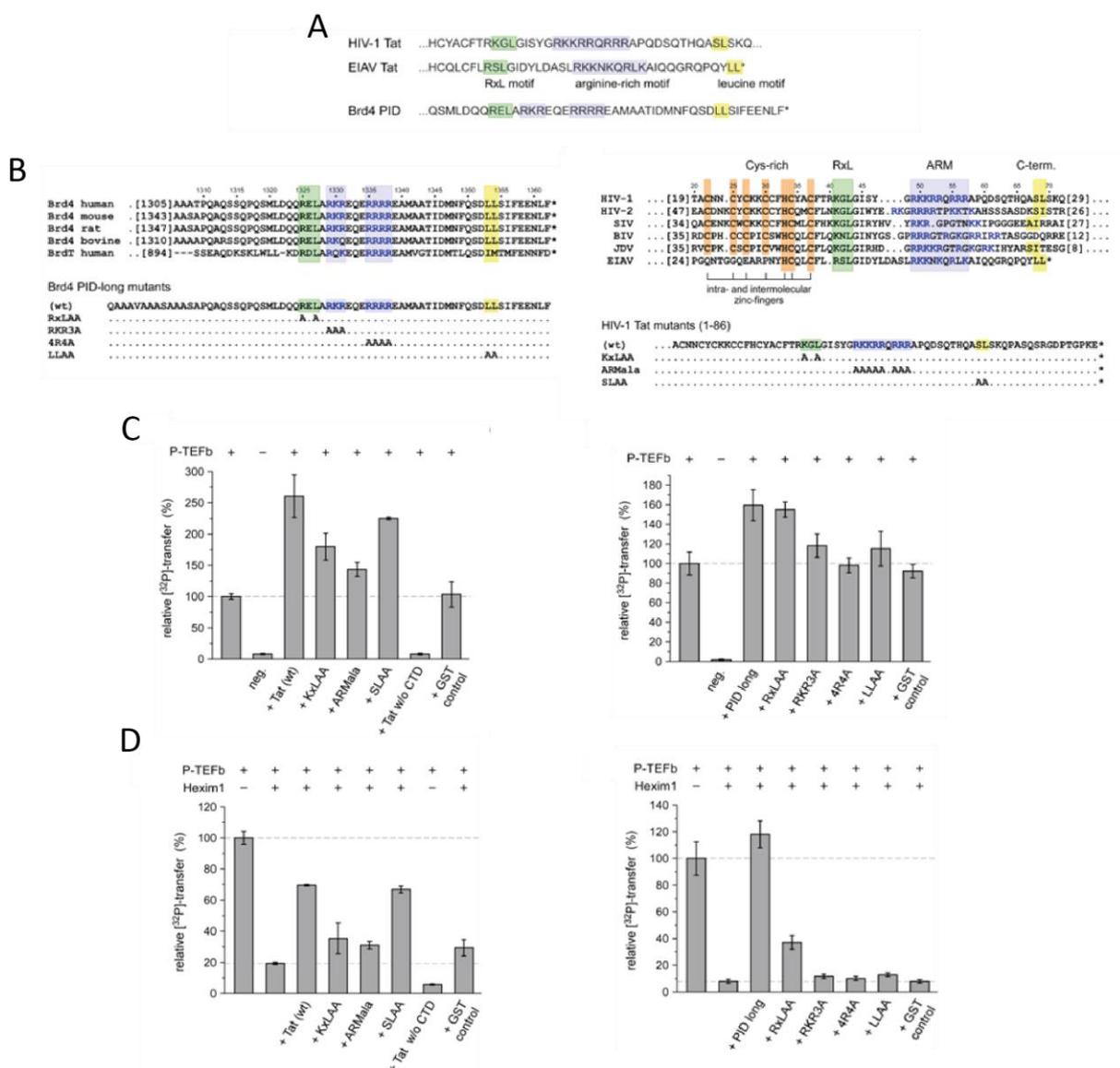


Abbildung 4.20: Sequenzübereinstimmungen von Brd4 und Tat mit anschließender Analyse von mutierten Sequenzmotiven in Brd4 und Tat

A: Sequenzalignment von Tat mit Brd4. **B:** Design verschiedener Brd4 und Tat Mutanten. Kinaseassay mit Brd4 und Tat Mutanten in **C:** Ab- und **D:** Anwesenheit von Hexim1.

So wurden drei ähnliche Sequenzmotive in Brd4 identifiziert, ein RxL Motiv, das ARM-Motiv und ein C-terminales Dileucin-Motiv, die in Tat bekannte, kanonische Sequenzmotive darstellen. Das RxL Motiv ist ein Erkennungsmotiv für die Cyclin-Untereinheit und bekannt für die Bindung an Cdk/Cyclin Paare (Endicott et al., 2012). Das polybasische Cluster, ein Arginin-reiches Motiv (ARM), ist in HIV-1 Tat für die Bindung an die TAR RNA verantwortlich. Dieses Motiv umfasst neun Aminosäuren und vermittelt zudem die Bindung an CycT1. Das kurze hydrophobe Cluster liegt 10 Aminosäuren von dem ARM Motiv entfernt und enthält zwei Leucine. Es interagiert über hydrophobe Interaktion mit CycT1 (Anand et al., 2008). Diese beschriebenen Sequenzmotive lassen vermuten, dass sie nicht nur eine stimulatorische Rolle bei der Interaktion zwischen Tat und TAR und CycT1, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Interaktion zwischen PID und P-TEFb spielen könnten. In den folgenden Experimenten wurden diese Sequenzmotive sowohl in Brd4 als auch in Tat zu Alanin mutiert (Abbildung 4.20 B). Eine Übersicht der Mutationen in Brd4 und Tat ist in Tabelle 4.1 zusammengefügt.

Tabelle 4.1: Übersicht über die eingeführten Mutationen

Sequenzmotif	in Brd4	mutiert zu	in Tat	mutiert zu	genannt
RxL motif	REL	AEA	KGL	AGA	R/KxLAA
ARM motif	RKR...RRRR	AAA...RRRR			RKR3A
		RKR...AAAA			4R4A
			RKKRR..RRR	AAAA..AAA	ARMala
Leucine motif	LL	AA	SL	AA	SLAA

Die in Abbildung 4.20 B dargestellte Cystein-reiche Region wurde schon in mehreren Studien als wichtiges Motiv für die Transaktivierung von Tat beschrieben (Lu et al., 2013) und wurde in dieser Studie nicht näher untersucht. Für die Charakterisierung und die Bestimmung des Einflusses der anderen Motive wurde der $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -markierte Assay mit 0,2 μM P-TEFb, 100 μM GST-CTD_{[9]KKK}, 10 μM mutiertes Brd4 oder Tat in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 μM Hexim1 genutzt (Abbildung 4.20 C). Das RxLAA Motiv hat in Brd4 den geringsten Einfluss. Hier konnte auch ohne das Sequenzmotiv eine leicht stimulierende Wirkung auf P-TEFb beobachtet werden. Durch die Mutation der anderen Motive blieb dieser Effekt aus. Dieser Effekt konnte durch die Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 noch stärker verdeutlicht werden (Abbildung 4.20 D). Für keine der vier Mutanten kann eine vollständige Reaktivierung nach Hexim1 Inhibition erreicht werden. Lediglich 37 % von P-TEFb konnten durch das fehlende RxL Motiv reaktiviert werden. Die anderen mutierten Sequenzmotive führten zu einer konstanten Inhibition von P-TEFb und konnten die Inhibition durch Hexim1 nicht beeinflussen. Somit sind sowohl die beiden polybasischen Cluster als auch das C-terminale hydrophobe Motiv für die Funktion von Brd4 als Aktivator für P-TEFb erforderlich.

Das HIV-1 Protein Tat hat ebenfalls einen stimulierenden Einfluss auf P-TEFb und führt zu einer 2,5-fach höheren Aktivität von P-TEFb. Es zeigte sich, dass keine der Mutanten eine Aktivierung von P-TEFb auf 250 %, wie sie Wildtyp Tat erreicht, vermitteln konnte. Mutationen sowohl in dem KxL als auch in dem ARM Motiv vermindern zwar diese Stimulation, liegen aber immer noch höher als ohne Tat. Das SLAA Motiv in Tat hat den geringsten Einfluss auf die P-TEFb Aktivität. Hier konnte keine deutliche Reduktion der Aktivität festgestellt werden. Auch in diesem Experiment konnte anhand der Hexim1 Inhibition der Effekt der Motive besser verdeutlicht werden. Anders als bei der Brd4 PID Stimulation, auch nach Hexim1 Inhibition, konnte bei Zugabe von Tat zum inhibierten P-TEFb Komplex nur 70 % der Aktivität zurückgewonnen werden. Das KxLAA und das ARMala Motiv scheinen hier eine Rolle bei der Verdrängung von Hexim zu spielen. Das ausgetauschte SL Motiv spielt keine Rolle. Zusammenfassend ist das RxL Motiv in Brd4 bzw. KxL Motiv in Tat und das polybasische Cluster in Brd4 genauso wichtig wie in Tat. Ein Unterschied besteht bei dem SL bzw. LL Motiv. In Tat ist das SL Motiv zu vernachlässigen, allerdings scheint es in Brd4 unabkömmlich. Anhand der eingeführten Mutationen wurde deutlich, dass die übereinstimmenden Motive zwischen Tat und Brd4 zwar nicht die gleiche Relevanz für die Aktivität von P-TEFb haben, aber alle eine wichtige Rolle spielen. Diese Motive müssen nicht zwangsläufig bei der direkten Bindung an P-TEFb beteiligt sein, sondern könnten auch die Sekundärstruktur von Bereichen, die an der Interaktion beteiligt sind, ändern oder zerstören.

Ein Funktionsmechanismus, der bereits für Tat/TAR beschrieben wurde, konnte nicht gezeigt werden, da eine Detektion der Bindung zu der CycT1 Untereinheit von P-TEFb ausblieb. Zudem spielen die Sequenzmotive unterschiedliche Rollen bei der Aktivierung von P-TEFb. Eine Gemeinsamkeit ist der stimulierende Effekt von Tat und Brd4 PID auf P-TEFb. Diese erhöhte Aktivität könnte auf eine schnellere Phosphorylierung des Substrats zurückzuführen sein oder mit einer Änderung der Substratspezifität verbunden sein. So könnte beispielsweise eine Doppelphosphorylierung innerhalb einer Wiederholung der CTD vorliegen. In Studien zu Tat konnte diese Hypothese nicht beobachtet werden (Bösken, 2013), soll aber in weiteren Analysen zu Brd4 untersucht werden.

4.3.3 Analyse der Substratspezifität von Brd4 PID aktiviertem P-TEFb

Der stimulierende Effekt der Brd4 PID auf die P-TEFb Aktivität könnte mit einer Änderung der Substratspezifität verbunden sein. Dazu wurden verschiedenen vorphosphorylierte CTD Peptide mit drei Wiederholungen der Heptadsequenz auf ihre Phosphorylieungseigenschaften durch P-TEFb mit und ohne Brd4 PID getestet. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Christian Bösken zunächst die cons. CTD_[3], pY1-CTD_[3], pS2-CTD_[3], pT4-CTD_[3], pS5-CTD_[3], pS7-CTD_[3] und K7-CTD_[3] im radioaktiven Kinaseassay untersucht (Abbildung 4.21).

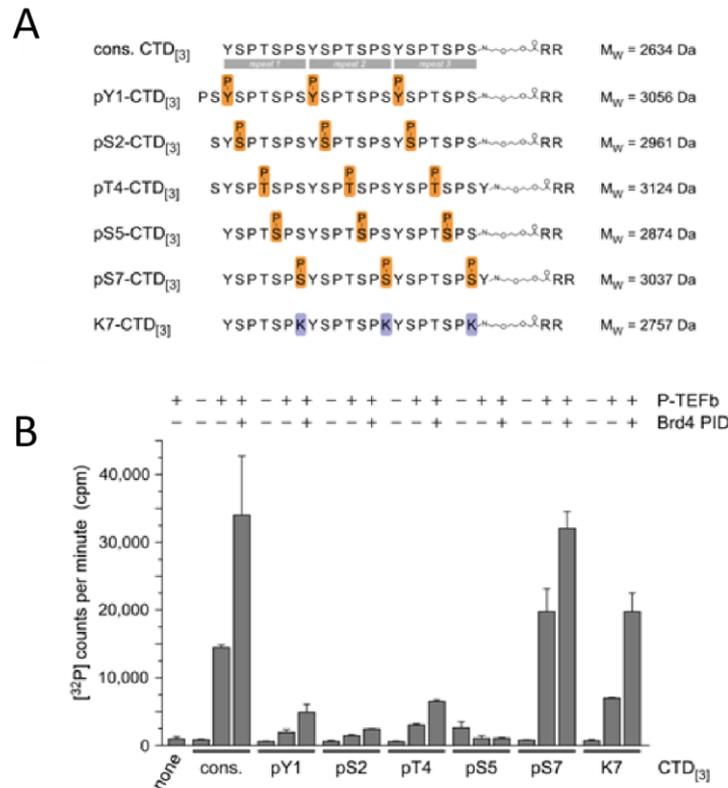


Abbildung 4.21: Substratspezifität von P-TEFb in Gegenwart von Brd4 PID für vorphosphorylierte CTD Substrate

A: Überblick über die Sequenz der CTD-Peptide. **B:** Phosphorylierung der CTD-Peptide durch P-TEFb in Gegenwart und Abwesenheit von Brd4 PID.

Vergleichbar zu den in Abbildung 4.20 C dargestellten Daten konnte hier ebenfalls in Anwesenheit von Brd4 PID eine Erhöhung der Übertragung der Phosphatgruppen auf die CTD durch P-TEFb beobachtet werden. Die katalytische Aktivität von Cdk9 wurde in Anwesenheit von Brd4 PID auf einer GST-CTD_{[9]KKK} um das 2-fache erhöht. Auf der K7-CTD_[3] konnte eine 2,4-fache Erhöhung detektiert werden, was auf eine eventuelle Messungenauigkeit zurückzuführen sein könnte. Bei den anderen vorphosphorylierten Peptiden konnte nur auf dem pS7-CTD_[3] Substrat eine deutlich erhöhte Aktivität festgestellt werden. Die anderen Peptide wurden weder von P-TEFb noch vom P-TEFb-PID Komplex effizient phosphoryliert. Somit konnte keine Änderung im Phosphorylierungsprofil der Kinase durch Zugabe von Brd4 PID nachgewiesen werden. P-TEFb zeigt mit Brd4 PID ebenso wie ohne Brd4 PID nur eine Präferenz für ein Ser7 vorphosphoryliertes Substrat oder ein Substrat ohne Vorphosphorylierung. In früheren Studien wurde gezeigt, dass P-TEFb *in vitro* das Serin an Position 5 phosphoryliert (Czudnochowski et al., 2012). Anhand des vorherigen Experiments konnte nicht ausgeschlossen werden, dass P-TEFb mit PID Serin 2 und nicht Serin 5 phosphoryliert. Daher wurden sowohl Western Blot Analysen als auch ein radioaktiver Kinaseassays mit anderen Peptiden durchgeführt, um eine Untersuchung der genauen Position der Phosphorylierung zu ermitteln.

CTD_[3] Substrat. Hier konnte eine 2,5-fach stärkere Aktivität im Vergleich zu einer nicht phosphorylierten CTD beobachtet werden. Außerdem konnte eine Direktionalität von P-TEFb bestätigt werden, wobei die richtungsabhängige Reaktion durch Zugabe von Brd4 PID nicht verändert wird. Um dieses Ergebnis nochmal mit einer anderen Technik zu bestätigen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt (Abbildung 4.23).

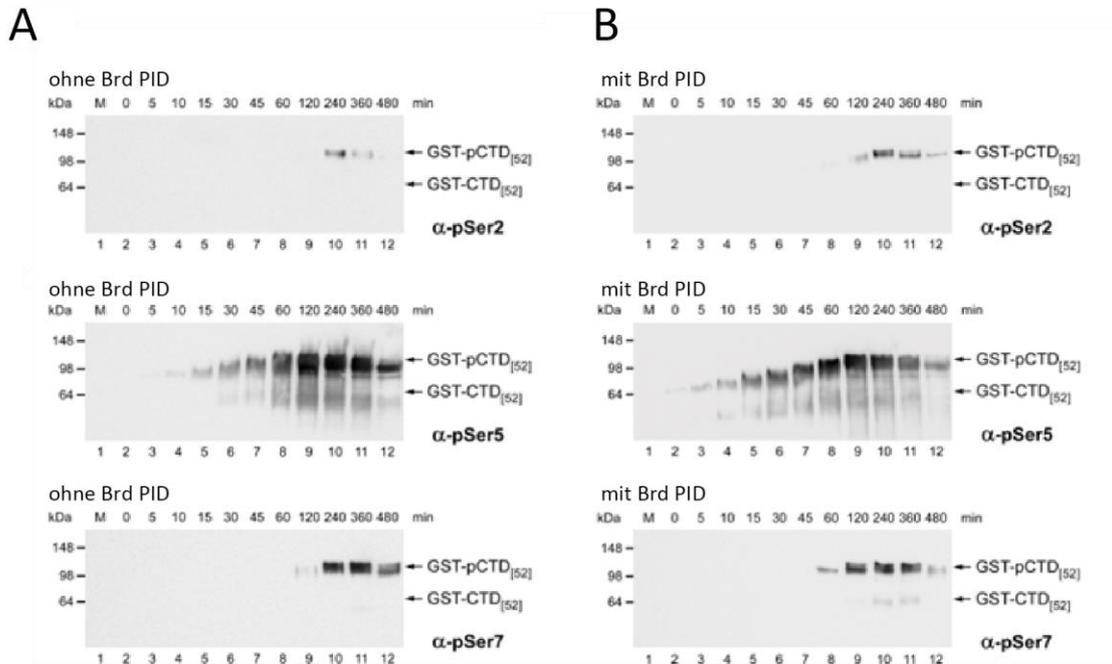


Abbildung 4.23: Western Blot Analyse zur Bestimmung der Substratspezifität von P-TEFb mit und ohne Brd4 PID

A: Zeitabhängige Phosphorylierung von 10 μM GST-CTD_[52] mit 0,2 μM P-TEFb. **B:** Zeitabhängige Phosphorylierung von 10 μM GST-CTD_[52] mit 0,2 μM P-TEFb und 10 μM Brd4 PID.

In diesem Assay wurden 10 μM GST-CTD_[52] mit 0,2 μM P-TEFb und 2 mM ATP versetzt, bei 30 °C inkubiert und die Reaktion zu den oben genannten Zeiten gestoppt. Zur Detektion der Phosphorylierungsposition wurden wieder die spezifischen Antikörpern gegen pSer2 (3E10), pSer5 (3E8) und pSer7 (4E12) verwendet. Deutlich erkennbar ist eine Phosphorylierung an Serin 5, was mit den vorher gemachten Beobachtungen übereinstimmt. Eine leichte Phosphorylierung an Position 7 kann ebenfalls detektiert werden, die aber erst über 2 h sichtbar wurde. In der Literatur ist ebenfalls eine *in vitro* Ser7 Phosphorylierung für P-TEFb beschrieben worden (Glover-Cutter et al., 2009). Peripher konnte außerdem eine Ser2 Phosphorylierung detektiert werden. In Gegenwart von Brd4 PID ändert sich diese Spezifität nicht, allerdings wird der stimulierende Effekt von Brd4 PID deutlich. Die schnellere Verschiebung von der hypophosphorylierten I_a zu der hyperphosphorylierten I_o-Form der CTD durch den P-TEFb-PID Komplex zeigt die aktivierende Wirkung von Brd4 auf die P-TEFb Kinase.

4.3.4 Brd4 als atypische Kinase

Während dieser Promotionsarbeit wurde Brd4 als atypische Proteinkinase beschrieben, die die Ser2 Position der RNAP II CTD *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert (Devaiah et al., 2012). Vor dem Hintergrund dieser neu beschriebenen Eigenschaft von Brd4 als Kinase zu fungieren, wurden Konstrukte von humanem Brd4 generiert, die sowohl in *E. coli* und als auch in Insektenzellen exprimiert wurden (Abbildung 4.24).

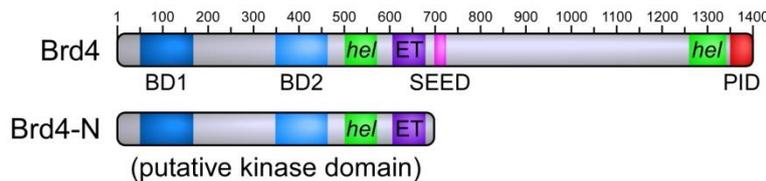


Abbildung 4.24: Domänenarchitektur von Brd4

Die Grenzen für das humane Brd4-N Konstrukt wurden wie in der Literatur beschrieben gewählt (Devaiah et al., 2012).

Die putative Kinasedomäne wurde in beiden Expressionssystemen erfolgreich exprimiert und über GST-Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie gereinigt. Allerdings konnte eine möglicherweise notwendige Phosphorylierung von Brd4 in *Sf9*-Zellen für die postulierte Kinaseaktivität nicht nachgewiesen werden. Zur Darstellung der Kinaseaktivität wurde ein radioaktiver Kinaseassay mit 2 μM Brd4, 10 μM GST-CTD_[52] oder 100 μM GST-CTD_{[9]KKK} mit und ohne Inhibition durch 2 μM JQ1 durchgeführt (Abbildung 4.25). Der Inhibitor JQ1 inhibiert die Bindung zwischen Brd4 und dem Chromatin, indem er die Bindungstasche für die acetylierten Lysine von Brd4 blockiert. Als Positivkontrolle diente in diesem Ansatz die Kinase P-TEFb und als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Kinase.

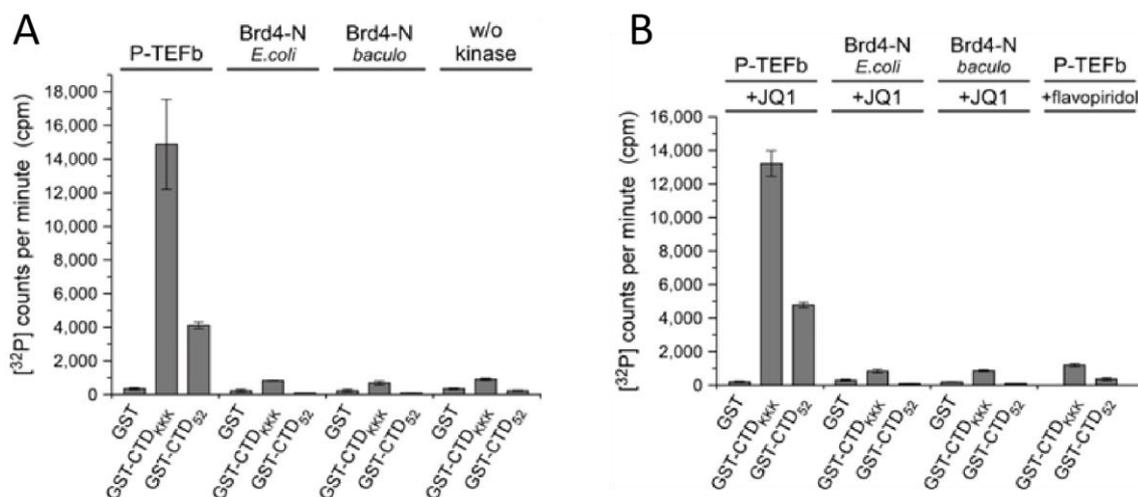


Abbildung 4.25: Vergleich der P-TEFb und Brd4 Aktivität als CTD Kinasen

A: Radioaktiver Kinaseassay von Brd4 und P-TEFb auf verschiedene Längen der CTD. **B:** Bestimmung des Einflusses des Inhibitors auf Brd4.

In Abbildung 4.25 A ist der Assay mit 2 μ M der Kinase Brd4-N aus *E. coli* und Brd4-N aus Baculo-Virus infizierten Sf9-Zellen im Vergleich zu P-TEFb auf 100 μ M GST-CTD_{[9]KKK} oder 10 μ M GST-CTD_[52] dargestellt. P-TEFb zeigt eine hohe Aktivität auf beiden Substraten, wohingegen keine Aktivität für Brd4 detektiert werden konnte. Weder die Kinase, die in Baculo-Virus infizierten Insektenzellen exprimiert wurde, noch die Kinase, die in *E. coli* exprimiert wurde, zeigten eine Phosphorylierung der CTD. Der Inhibitor JQ1 zeigt ebenfalls keinen Effekt auf Brd4 (Abbildung 4.25 B).

Brd4 trägt sowohl zur Regulation des Zellzyklus als auch zur Transkription von Oncogenen, HIV und menschlichen Papilloma-Virus (HPV) bei. Trotz seiner Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen ist der genaue molekulare Mechanismus der Brd4 Funktion unbekannt und konnte in diesen Studien nicht geklärt werden. Das Bromodomäne enthaltene Protein wurde als therapeutisches Ziel in akuter myeloische Leukämie, multiplem Myelom, Burkitt-Lymphom, NUT midline Karzinom, Dickdarmkrebs, Brustkrebs und Entzündungserkrankungen identifiziert (Delmore et al., 2011; French et al., 2003; Mertz et al., 2011; Nicodeme et al., 2010; Rodriguez et al., 2012; Zuber et al., 2011) und stellt einen Angriffspunkt für Therapeutika dar, daher ist die Aufklärung des Mechanismus von großer Bedeutung. Neben Brd4 ist AFF4 als ein weiterer Cofaktor für die Aktivierung von P-TEFb bekannt. AFF4 wird im nächsten Abschnitt behandelt und hat ebenfalls Einfluss auf eine Vielzahl von biologischen Prozessen.

4.3.5 Einfluss des zellulären Cofaktors AFF4

AFF4 ist Teil des Superelongationskomplexes (SEC) und bindet als Transkriptionseffektor an P-TEFb. AFF4 ist an der Regulation von Transkriptionsprozessen beteiligt und aktiviert über MLL-Proteine die Expression spezifischer Gene (Biswas et al., 2011; He et al., 2010; Lin et al., 2010). Zu Beginn dieser Arbeit war die Interaktion von dem Cofaktor AFF4 mit der Kinase P-TEFb nur unzureichend beschrieben. Um den Einfluss von AFF4 auf die spezifischen Präferenzen von P-TEFb für die CTD Substrate zu analysieren, wurde die Fähigkeit von P-TEFb unterschiedlich vorphosphorylierte CTD Peptide in Anwesenheit des Cofaktors zu phosphorylieren getestet. Zudem sollte die Bindungsdomäne von AFF4 an den Transkriptionsfaktor P-TEFb bestimmt werden. Dazu wurden unterschiedliche Konstrukte des 1163 Aminosäure langen Proteins von Frau Dr. Friederike Itzen entworfen (Abbildung 4.26). Über die genaue Domänenstruktur von AFF4 ist noch nichts Genaueres bekannt.

Der N-Terminus wurde als hinreichend für die Interaktion an P-TEFb identifiziert (He et al., 2010; Lin et al., 2010), daher wurde in unseren Arbeiten der Fokus auf verschiedene Längen des N-Terminus von AFF4 gelegt. Als negative Kontrolle dienten dabei die beiden Konstrukte AFF4-C und AFF4-F, die beide den N-Terminus nicht beinhalten.

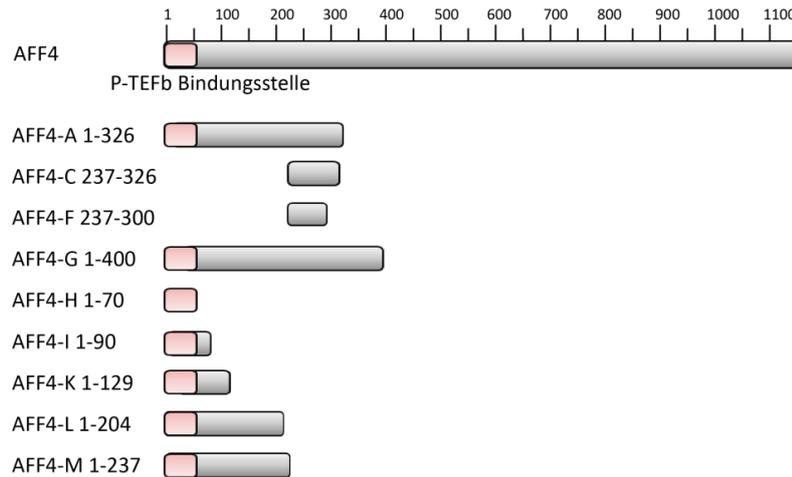


Abbildung 4.26: Domänenarchitektur von humanem AFF4

Dargestellt sind die unterschiedlichen Längen der AFF4 Konstrukte. Der in rosa abgebildete N-terminale Bereich stellt das Bindungsmotiv für P-TEFb dar.

Die Konstrukte wurden in *E. coli* exprimiert und über GST-Affinitätschromatographie gereinigt. Beispielhaft sind von den Konstrukten AFF4-A, AFF4-H und AFF4-I massenspektrometrische Messungen zur Überprüfung der richtigen Größe der Proteinprodukte dargestellt (Abbildung 4.27).

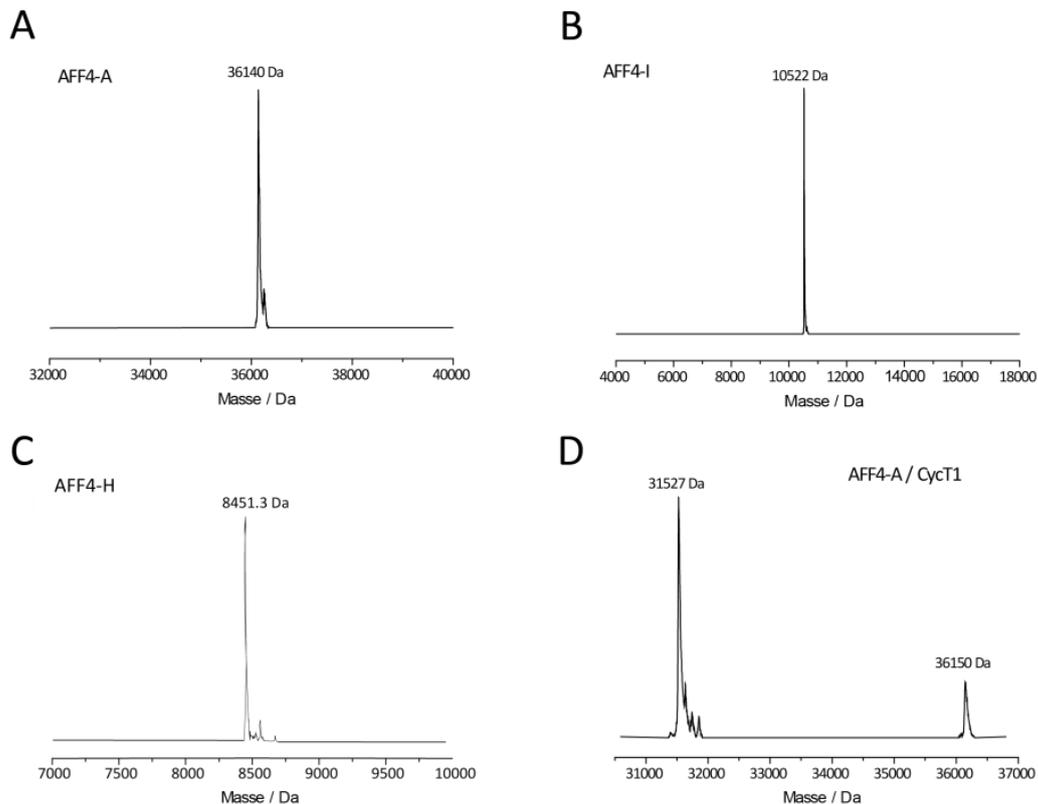


Abbildung 4.27: ESI-MS nach Reinigung der AFF4 Konstrukte

Beispielhaft für alle AFF4 Konstrukte sind hier die ESI-MS Analysen von **A**: AFF4-A, **B**: AFF4-I und **C**: AFF4-H dargestellt, zusätzlich ist ein Spektrum nach Coreinigung von **D**: AFF4-A mit Cyt1 gezeigt.

Die mittels ProtParam berechneten Größen der Proteinprodukte stimmen im Rahmen der Messungenauigkeit mit den gemessenen ESI-MS Werten überein (Abbildung 4.27 A-C). Für AFF4-A wurde eine Masse von 36.140 Da, für AFF4-I eine Masse von 10.522 Da und für AFF4-H eine Masse von 81451 Da bestimmt. Die Abweichung zu den mittels ProtParam berechneten Massen beträgt 1-3 Da. Zusätzlich wurde eine Coexpression von AFF4-A mit CycT1 mit anschließendem ESI-MS durchgeführt (Abbildung 4.27 D). Beide Peaks passen zu den errechneten Größen der Proteine. Um nun die Sekundärstrukturanteile des AFF4-A Proteins alleine und in Bindung an CycT1 zu bestimmen, wurden CD Spektren in 5 mM KP_i Puffer, pH 7,5, aufgenommen. Das CD-Spektrum wurde im Wellenbereich von 190-260 nm bestimmt und die mittlere molare Elliptizität pro Rest θ in Abhängigkeit der Wellenlänge aufgetragen (Abbildung 4.28).

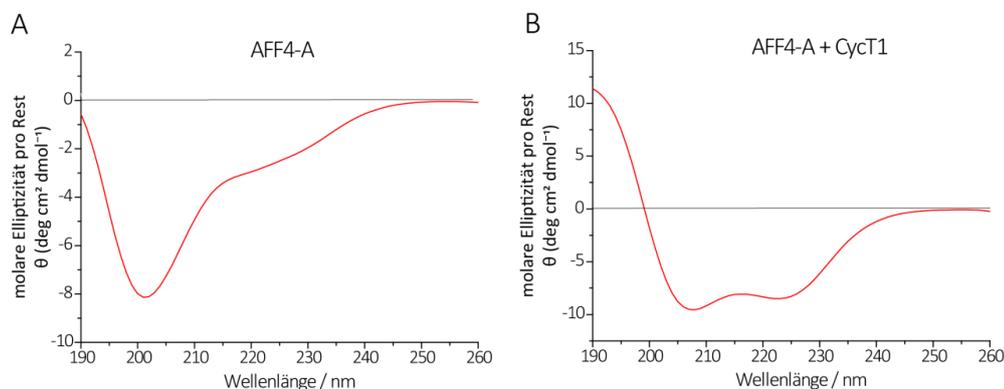


Abbildung 4.28: Bestimmung der Sekundärstruktur von AFF4-A

A: CD Spektrum von AFF4-A allein. **B:** CD Spektrum von AFF4-A im Komplex mit CycT1.

Ein CD-Spektrum von AFF4 1-326 allein (Abbildung 4.28 A) wurde mit einem Spektrum von AFF4 coexprimiert mit CycT1 (Abbildung 4.28 B) verglichen. Unter Verwendung des Programms Dichroweb konnte eine Abschätzung der Sekundärstrukturanteile ermittelt werden. Dabei liegt AFF4-A alleine zu 47,4 % als random coil, zu 48,9 % als β -sheet und zu 3,7 % als β -turn vor. α -helikale Strukturelemente konnten nicht gefunden werden. Diese mehrheitlich intrinsisch ungeordnete Struktur wurde auch mit dem Programm RONN (Regional Order Neural Network), welches anhand von Aminosäuresequenzen ein Ordnungsprofil von Proteinen vorhersagt, in ähnlicher Weise ermittelt (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Spektrum der Coexpression von den beiden Proteine AFF4-A mit CycT1 hingegen präsentiert eine weitgehend α -helikale Struktur. In diesem, durch analytische Gelfiltration nachgewiesenen, stöchiometrischen Komplex liegt die Struktur zu 89 % α -helikal vor. Da AFF4 mit 326 Aminosäuren im Vergleich zu CycT1 mit 272 Aminosäuren über 50 % des gesamten Proteingehaltes darstellt, muss folglich ein erheblicher Anteil auch auf AFF4 zurückzuführen sein. Damit scheint AFF4-A bei einer Interaktion mit CycT1 seine Struktur zu verändern und geordneter vorzuliegen. So nimmt die Bindung von CycT1 Einfluss auf die Sekundärstruktur von AFF4, was zu einer veränderten Eigenschaft von AFF4 führen könnte.

Als nächstes wurde die Komplexbildung von CycT1 mit verschiedenen AFF4 Konstrukten quantitativ und qualitativ untersucht. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Friederike

Itzen mit Hilfe von ITC Messungen die Dissoziationskonstanten und Bindungsparameter bestimmt und mittels analytischer Gelfiltrationen die Homogenität und der Oligomerisierungszustand der Proteine im Komplex und alleine ermittelt (Abbildung 4.29).

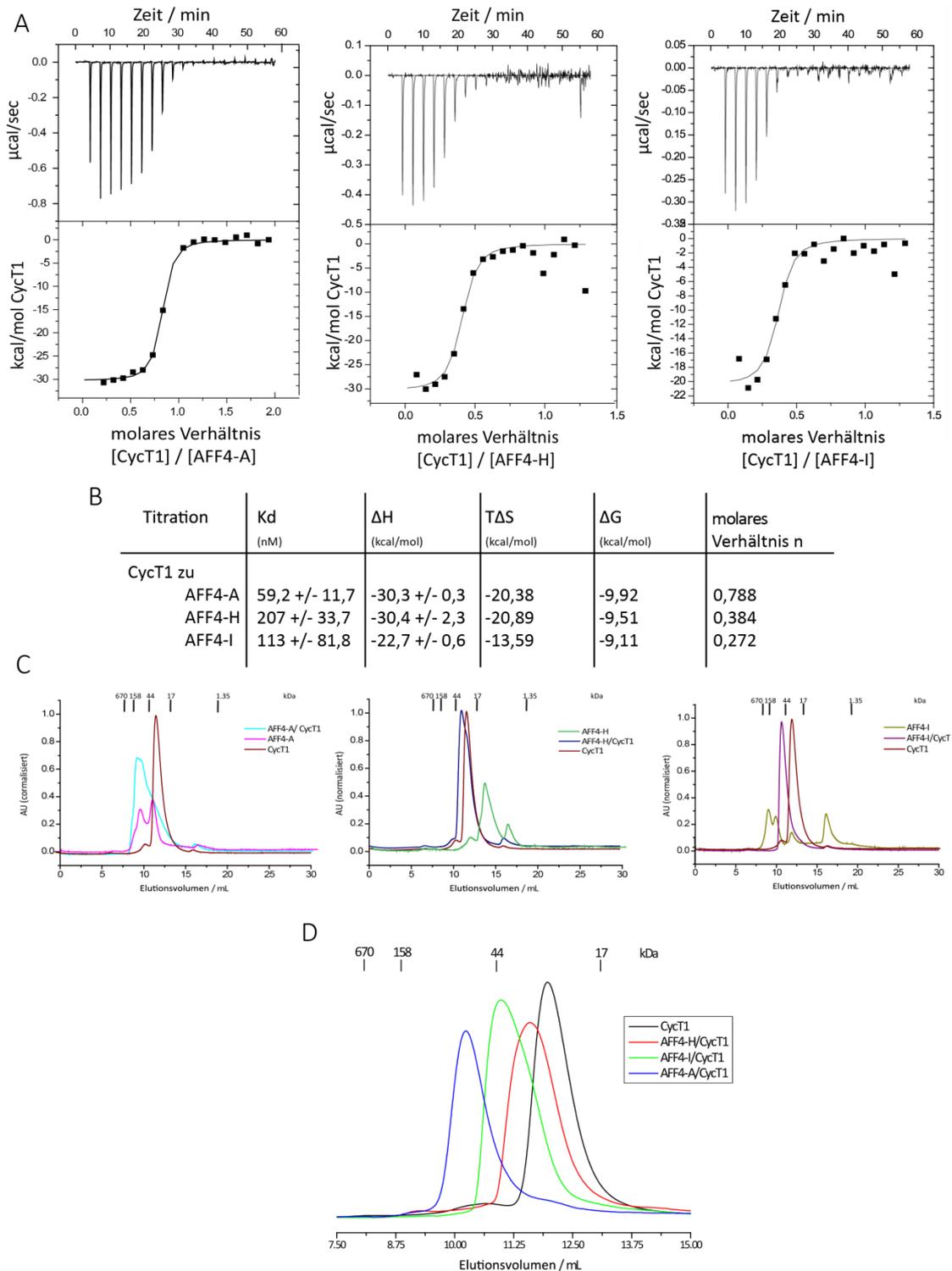


Abbildung 4.29: Bindungsstudien zur Interaktion der humanen Proteinen AFF4 und CycT1

A: ITC Titration von je 100 μM CycT1 zu 10 μM der verschiedenen AFF4 Konstrukte. **B:** Tabelle der thermodynamischen ITC Parameter. **C:** analytische Gelfiltration der AFF4 Konstrukte und CycT1 alleine und im Komplex. **D:** analytischer Vergleich der AFF4/CycT1 Komplexe.

In Abbildung 4.29 A sind ITC Messungen von CycT1 zu AFF4-A, AFF4-H und AFF4-I dargestellt und die jeweiligen Bindungsparameter berechnet. Dazu wurden zu 10 μM des jeweiligen AFF4 Konstrukts in der Zelle in Injektionsschritten von jeweils 2 μL 100 μM CycT1 titriert. Es konnten Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich ermittelt werden. Die Dissoziationskonstante der Bindung von CycT1 und AFF4-A wurde auf 59,2 nM bestimmt, von CycT1 an AFF4-H auf 207 nM und von CycT1 an AFF4-I auf 113 nM. Beide Komponenten der ersten Messung liegen im Komplex in einem Verhältnis von 1:1 vor. Die Stöchiometrie der beiden anderen Messungen legen eine 1:3 Bindung nahe, allerdings sind die Proteine sehr klein und daher sind Fehler bei der Konzentrationsbestimmung nicht ausgeschlossen. Die weiteren thermodynamischen Parameter sind in Abbildung 4.29 B zusammengefasst. Es handelt sich bei allen Reaktionen um eine exotherme Reaktion, die mit einem Verlust an Entropie verbunden ist. Bei der Bindung von CycT1 an AFF4 findet eine Konformationsänderung statt, die anhand der CD Spektroskopie ermittelt wurde. Weiterhin wurde die Bindung der AFF4 Konstrukte durch analytische Gelfiltrationsexperimente untersucht (Abbildung 4.29 C und D). Man kann deutlich erkennen, dass alle drei Proteine an CycT1 binden und zu einer Veränderung des Elutionsprofils führen. Auffällig ist, dass die AFF4 Konstrukte alleine nicht sehr homogen und geordnet zu sein scheinen, was durch die CD spektroskopischen Analysen und die analytischen Gelfiltrationen belegt werden konnte. Erst durch Bindung an CycT1 wird AFF4 stabilisiert. Zudem konnte bei allen Messungen keine Dimerisierung der Protein-Komplexe festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein 1:1-Komplex zwischen CycT1 und AFF4 gebildet wurde.

In weiteren Studien sollte nun der Einfluss der verschiedenen Konstrukte auf die Aktivität von P-TEFb untersucht werden. Bekannt ist, dass AFF4 in der Lage ist, durch Hexim1 inhibiertes P-TEFb wieder zu aktivieren. Unter Verwendung eines Kinaseassays mit radioaktiv-markiertem Co-Substrat ATP wurde der Effekt der Proteine qualitativ und quantitativ bestimmt (Abbildung 4.30). Hexim1 wurde in den Grenzen 200-359 verwendet, das für die vollständige Inhibition von P-TEFb hinreichend ist (Czudnochowski, 2009). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Kinase gewählt, um eine Kontamination der verwendeten Lösungen durch ein Enzym auszuschließen. Der Ansatz mit P-TEFb und Substrat wurde zu 100 % gesetzt und alle anderen Werte entsprechend dazu berechnet. 0,2 μM Kinase, 100 μM GST-CTD_{[9]KKK} als Substrat, 2 μM Hexim1 200-359 und 10 μM AFF4 wurden über 15 min bei 30 °C inkubiert und anschließend gemessen.

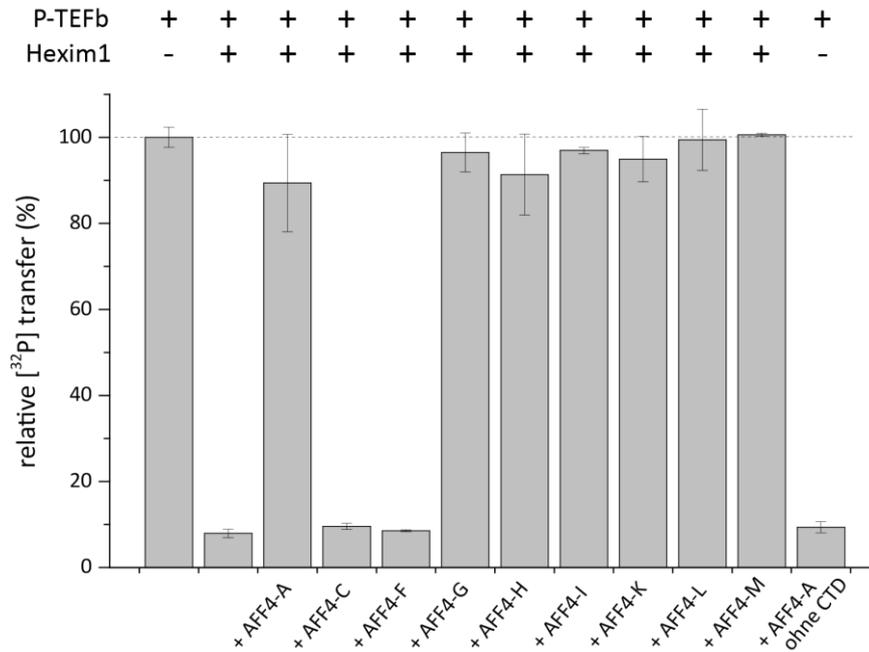


Abbildung 4.30: Einfluss der verschiedenen AFF4 Konstrukte auf die Aktivität von P-TEFb

Radioaktiver Kinaseassay von P-TEFb auf GST-CTD_{[9]KKK} mit Inhibition durch Hexim1 und Zugabe verschiedener Längen von AFF4.

Durch Hexim1 200-359 kann in diesem Assay eine P-TEFb Inhibition auf 10 % erreicht werden. Die, im Vergleich zu vorhergegangenen Experimenten, schlechtere Inhibition in dem oben dargestellten Assay kann möglicherweise auf eine GST-Kontamination in der Hexim1 Proteinprobe zurückgeführt werden. Somit liegt eine niedrigere Hexim1 Konzentration als 2 μM vor. In Anwesenheit von AFF4-C und AFF4-F konnte keine signifikante Steigerung der Aktivität von P-TEFb nach Hexim1 Inhibition erkannt werden. Dagegen bewirkten die Inkubationen des inhibierten P-TEFb Komplexes mit allen N-terminal enthaltenen AFF4 Konstrukten eine Wiederherstellung der Kinaseaktivität. Es konnte keine weitere Steigerung der Aktivität verzeichnet werden. Eine Phosphorylierung von dem AFF4-A Konstrukt selbst durch P-TEFb konnte ausgeschlossen werden. Somit können Konstrukte, die das N-terminale Ende von AFF4 nicht beinhalten, dem inhibitorischen Effekt von Hexim1 nicht entgegenwirken. Entsprechend dieser Ergebnisse spielt nur der N-Terminus von AFF4 bei der Aufhebung der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 eine Rolle, wobei AFF4 selbst kein Substrat für P-TEFb darstellt.

Die Stimulation von P-TEFb durch AFF4 sollte nun in einem ATP-konzentrationsabhängigen radioaktiven Kinaseassay nachvollzogen werden. Zudem sollte eine maximale Aktivität von P-TEFb durch eine Konzentrationserhöhung von AFF4 bestimmt werden (Abbildung 4.31).

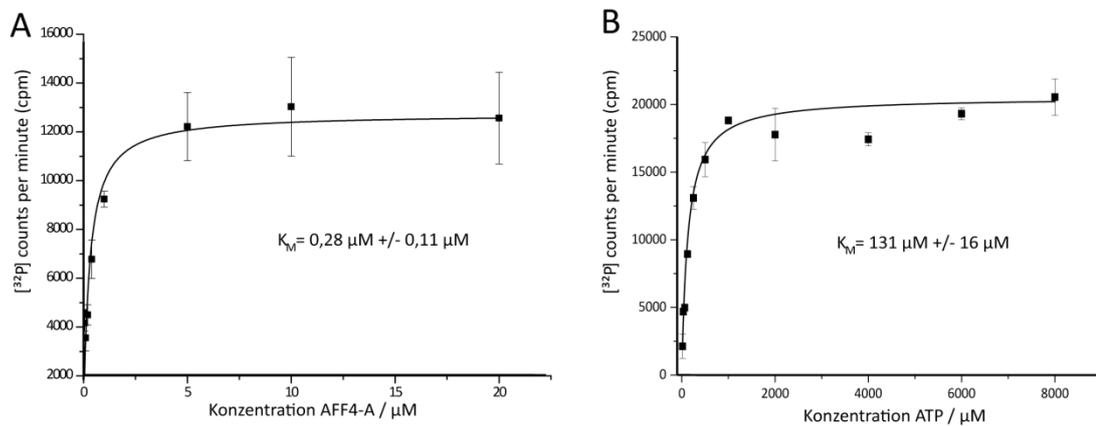


Abbildung 4.31: Konzentrationsreihen von AFF4 und ATP zur Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetik der P-TEFb Aktivität

A: Radioaktiver Kinaseassay mit P-TEFb auf GST-CTD_{[9]KKK} mit 2 µM Hexim1 200-359 und steigender Konzentration an AFF4-A zur Bestimmung des Einflusses der Konzentration von AFF4 auf die Reaktion. **B:** ATP konzentrationsabhängiger radioaktiver Kinaseassay mit P-TEFb auf GST-CTD_{[9]KKK} mit 2 µM Hexim1 200-359 und 10 µM AFF4-A.

Eine zusätzliche Erhöhung der Konzentration an AFF4 könnte einhergehen mit einer zusätzlichen Erhöhung der Aktivität von P-TEFb. Da bei einer Konzentration von 5 µM AFF4 die maximale Kinaseaktivität erreicht wurde, ist diese Konzentration für nachfolgende Experimente ausreichend. Eine halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit liegt bei 0,28 µM vor. Eine Änderung der Substratspezifität von P-TEFb durch AFF4 konnte ausgeschlossen werden (Bösken, 2013).

Da AFF4 die Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 aufheben kann, sollte im Folgenden die Verdrängung oder Synergie von AFF4 und Hexim1 auf P-TEFb untersucht werden. Es könnte ähnlich zu dem Mechanismus, der für das HIV-1 Tat Protein beschrieben wurde, eine Kompetition um die Bindungsstelle an CycT1 vorliegen. Sowohl Tat als auch Hexim1 und AFF4 haben ihre Bindungsstelle auf der CycT1 Untereinheit von P-TEFb, daher wurde nur CycT1 als Bindungspartner untersucht. In einem GST-Immobilisationstest konnte gezeigt werden, dass an CycT1 gebundenes Hexim1 durch Tat/TAR verdrängt wird (Barboric et al., 2007), was durch Kristallisationsstudien bestätigt wurde (Anand et al., 2008). Dieser Immobilisationstest soll nun Aufschluss über die potentielle Verdrängung von Hexim1 durch AFF4 geben (Abbildung 4.32).

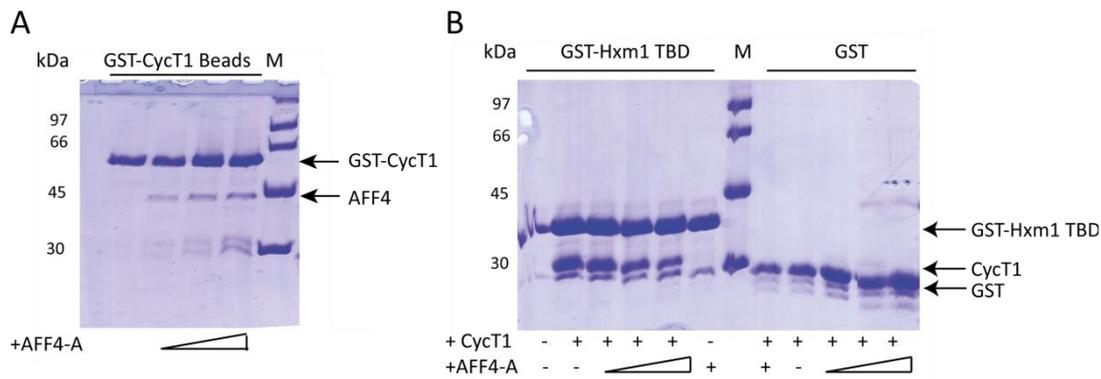


Abbildung 4.32: Bindungsexperiment von AFF4 und Hexim1 an CycT1

A: Bindung von GST-CycT1 an AFF4. **B:** Bindung von CycT1 an GST-Hxm1 TBD, durch Zugabe von AFF4 wird CycT1 von Hexim1 abgelöst und bindet an AFF4.

Zunächst wurde GST immobilisiertes CycT1 verwendet. Zu diesem Protein wurde eine steigende Konzentrationen von AFF4 (1-326) hinzugegeben, um die Bindung von AFF4 an CycT1 in einem Pulldown Experiment zu zeigen (Abbildung 4.32 A). Man kann eine deutliche Zunahme der Bande bei 45 kDa erkennen, was der Größe des AFF4 Proteins entspricht. Als nächstes wurde GST-Hexim1 TBD an GSH Beads gebunden. In einer nächsten Reihe wurden CycT1 in gleichbleibender Konzentration und AFF4-A in ansteigender Konzentration hinzugegeben. Durch die Zugabe von AFF4-A konnte eine schrittweise Abnahme der CycT1 Bande beobachtet werden. Die Abnahme der Bande zeigt indirekt die Bindung von CycT1 an AFF4-A an und somit die Verdrängung von CycT1 von der Hexim1 TBD. Auch wurden keine Anzeichen für die Bildung einer ternären Komplexes bestehend aus GST-Hexim1 TBD, CycT1 und AFF4 beobachtet, da keine Präzipitationsbande bei etwa 45 kDa zu erkennen war. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass AFF4-A CycT1 von Hexim1 verdrängen kann und CycT1 stärker an AFF4 bindet. Als Negativkontrolle dienen GST-immobilisierte Beads, an denen eine Bindung von CycT1 und AFF4-A ausgeschlossen werden konnte.

Kristallisationsscreens von CycT1 (1-272) mit AFF4 (1-326) wurden ebenfalls durchgeführt, um die Bindung der Proteine strukturell zu bestimmen. Allerdings wurde im Verlauf dieser Arbeit die Struktur des Komplexes aus P-TEFb/AFF4 und von P-TEFb/AFF4/Tat gelöst (Schulze-Gahmen et al., 2013). Dabei schlängelt sich AFF4 über die Oberfläche der Cyclin T1 Untereinheit, geht aber keine stabilen Kontakte mit der Cdk9 Untereinheit ein. AFF4 bildet jedoch direkte Kontakte zu Tat aus, was zu einer Verbesserung der P-TEFb Affinität zu AFF4 führt. Diese Studien führten zu dem Mechanismus, dass P-TEFb das Gerüst von AFF4 erkennt und diese Bindung als potentielles Ziel für therapeutische Eingriffe gegen HIV/AIDS dienen könnte (Schulze-Gahmen et al., 2013). Um die Präferenz der Bindung von SEC an Tat/TAR zu verstehen, wurde von dieser Gruppe auch der P-TEFb/Tat/AFF4 Komplex gelöst. Dabei falten sich Tat und AFF4 über die Oberfläche von CycT1 und interagieren mit CycT1. Mutationsstudien des Homologs von AFF4, AFF1, zeigen eine Reduktion der Affinität zwischen Tat und

AFF1, wodurch die Tat abhängige Transkription verringert werden könnte. Die AFF4 Bindung in Gegenwart von Tat bestimmt das CycT1 Tat/TAR Erkennungsmotiv und erhöht die Affinität von Tat/P-TEFb für TAR um das 30-fache. Die Interaktion zwischen AFF4 und Tat wird überwiegend durch hydrophobe Kräfte und van-der-Waals Wechselwirkungen bestimmt, aber auch Wasserstoffbrückenbindungen sind beteiligt. Die helikale Struktur von AFF4 in dem Komplex bestätigt unsere CD spektroskopischen Analysen (Schulze-Gahmen et al., 2014). Diese Studien zeigen, dass AFF4 wie ein Zwei-Stufen-Faktor wirkt: Zum einen vermittelt es die Selektivität von Tat/TAR für SEC und zum anderen erhöht es die Affinität von Tat allein zu P-TEFb (Schulze-Gahmen et al., 2014). Unsere Daten unterstützen das Modell, das Tat und AFF4 unterschiedliche Elongationsfaktoren in einem bifunktionellen Komplex rekrutieren, so dass ELL2 und P-TEFb ihre Funktion koordinieren und die Prozessierbarkeit der RNAP II stimulieren.

4.4 Darstellung neuer Cdk-Inhibitoren

Fehlregulationen im Zellzyklus spielen eine wichtige Rolle in maligner Entartung und der Entwicklung von Chemotherapieresistenz (Shapiro, 2006). Über- oder Unterexpression von Cdks und ihrer Cycline, die den Zellzyklus regulieren, wurden in einer Vielzahl von Tumoren und proliferativen Erkrankungen beobachtet, darunter Melanomen (Abdullah et al., 2011), multiplem Myelom (McMillin et al., 2011), hypophyse Adenome und Karzinome (Quereda and Malumbres, 2009), chronischer lymphatischer Leukämie (Hahntow et al., 2004) und andere malignen Erkrankungen (Johnson and Shapiro, 2010). Diese Feststellung hat das Interesse an der Entwicklung neuer Antikrebsmittel gegen Cdks angetrieben. Zur Antikrebsbehandlungen sind Cdk-Inhibitoren gefunden worden, die nicht nur die Zellzyklusprogression blockieren, sondern auch die Apoptose, die zum Zelltod führt.

4.4.1 Cdk und Cyclin Alignments

Zur Darstellung neuer Inhibitoren wurden zunächst wichtige Strukturelemente, Sequenzähnlichkeiten aber auch Unterschiede verschiedener Kinasen verglichen. Dazu wurden Sequenzalignments mit dem Programm MultAlin und ESPript 3.0 durchgeführt (Abbildung 4.33 und Abbildung 4.34).

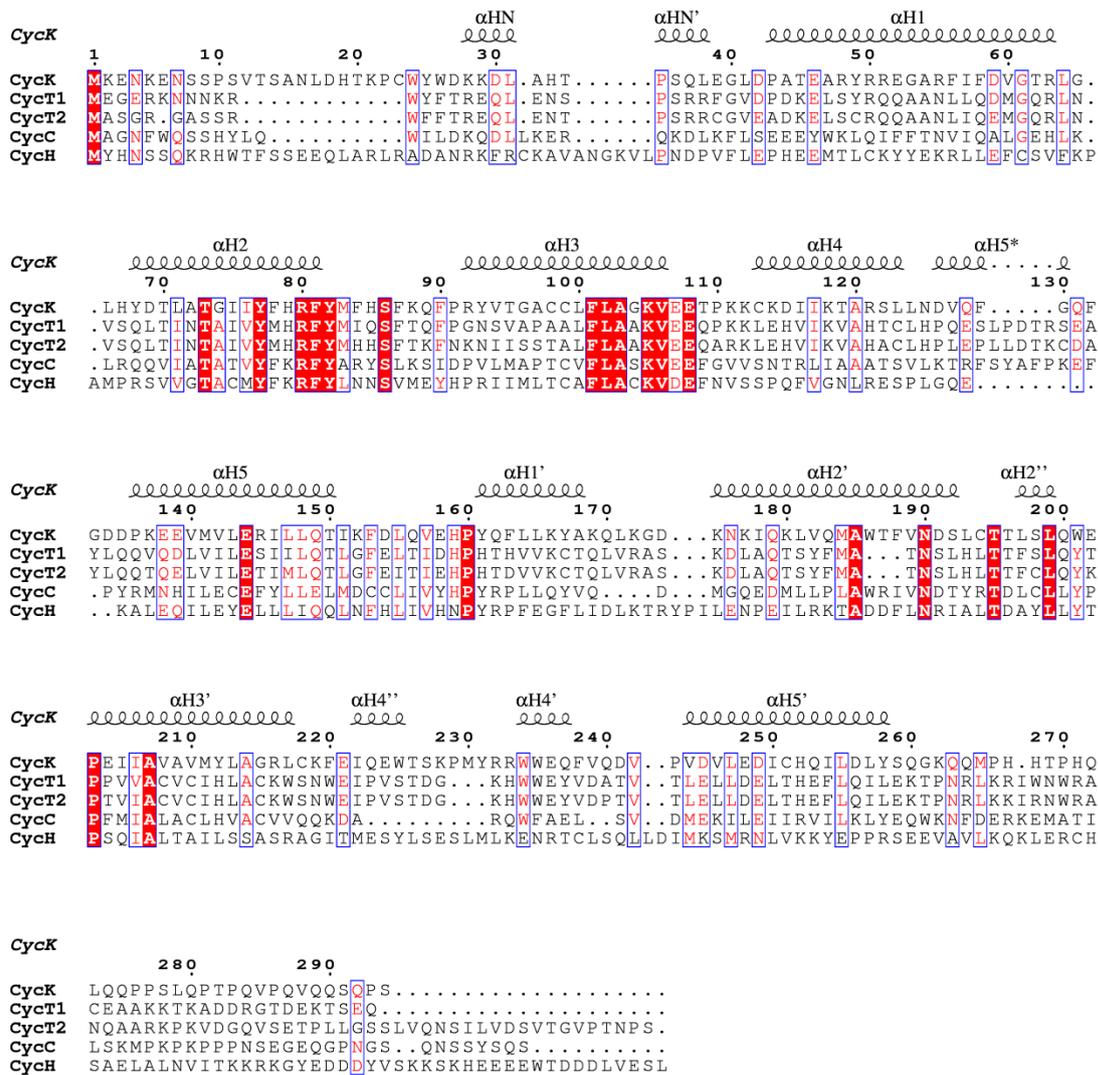


Abbildung 4.33: Cyc Alignments

Sequenzalignments der Cyclobox Domänen der humanen Proteine CycK, CycT1, CycT2, CycC und CycH bezogen auf CycK. Die angegebenen Sekundärstrukturelemente wurden für CycK bestimmt. Konservierte Reste sind in roten Boxen und ähnliche Aminosäuren in rot dargestellt. Die UniProt Zugangsnummern sind: O75909, PDB: 4NST (CycK Menschen), 060563 (CycT1 Menschen), 060583 (CycT2 Menschen), P24836 (CycC Menschen), P51946 (CycH Menschen). Die Sequenzalignments wurden mit MultAlin durchgeführt und die Sekundärstrukturelemente von Cyclin K, die oberhalb dargestellt sind, mit ESPrit.

Dargestellt sind zunächst die transkriptionsinvolvierten Cyline CycK, CycT1, CycT2, CycC und CycH. Die Sekundärstruktur der Cyline weist ausschließlich α -helikale Bereiche

auf. Die Helix H5 des CycK bildet mehrere Wechselwirkungen mit dem N-terminalen Flügel der Kinase Cdk12 aus. Aufgrund der geringen Konservierung könnten diese Aminosäurereste zur Spezifität der Komplexbildung beitragen. Die C-terminale Region von CycK, die hinter den Cyclin-Boxen lokalisiert ist, weist eine hohe Anzahl an Prolinen und Glutaminen auf. Alle transkriptionsinvolvierten Cycline enthalten im Vergleich zu CycA eine lange Schleife zwischen den Helices H4 und H5. Diese Unterschiede könnten die Erkennungsspezifität der Cdk/Cyc regulierenden Faktoren generieren. Verschiedene Substrate, Inhibitoren und Aktivatoren wie beispielsweise Tat oder Hexim1 zeigten eine Interaktion mit dieser Oberflächenstruktur der Cyclin Untereinheit in verschiedenen Cdk/Cyc Komplexen (Anand et al., 2008; Brown et al., 1999; Dames et al., 2007; Russo et al., 1996a; Schulze-Gahmen et al., 2013).

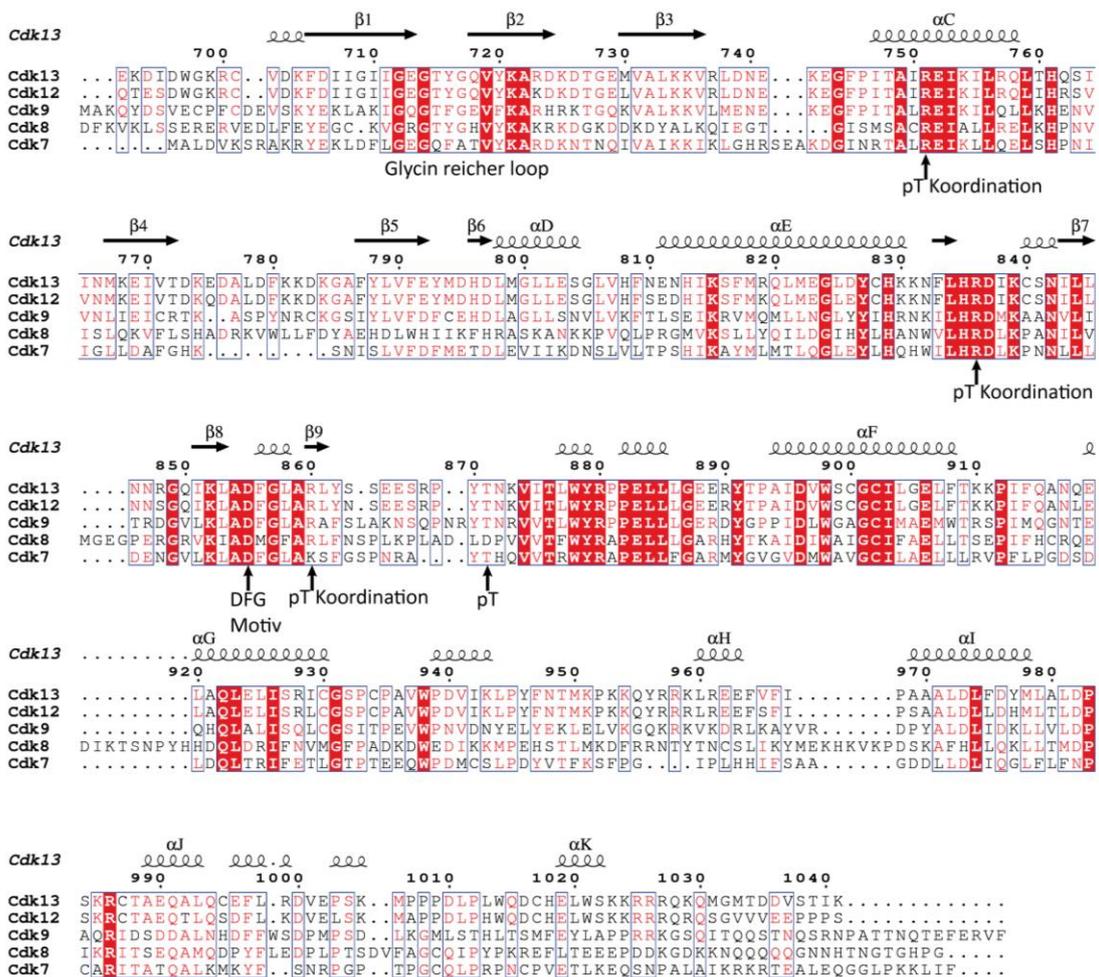


Abbildung 4.34: Cdk Alignments

Sequenzalignments der humanen Kinasen Cdk13, Cdk12, Cdk9, Cdk8 und Cdk7 bezogen auf Cdk13. Die angegebenen Sekundärstrukturelemente wurden für Cdk13 bestimmt. Konservierte Reste der Cdk's sind in roten Boxen und ähnliche Aminosäuren in rot dargestellt. Die UniProt Zugangsnummern sind: Q14004 (Cdk13 Menschen), Q9NYV4 (Cdk12 Menschen), P50750 (Cdk9 Menschen), P49336 (Cdk8 Menschen), P50613 (Cdk7 Menschen). Die Sequenzalignments wurden mit MultAlin durchgeführt und die Sekundärstrukturelemente mit ESPrit.

Die katalytische Domäne von Cdks ist insgesamt stärker konserviert und besteht aus etwa 290 Aminosäuren. Das aktive Zentrum liegt zwischen dem aus einem fünf-strängigen β -Faltblatt und einer charakteristischen α -Helix bestehenden N-terminalen lobe und dem C-terminalen lobe. Die Glycin-reiche Region am N-terminalen lobe stabilisiert die Bindung des ATPs. Die Phosphorylierung der Kinasen an Position 871 für Cdk13 ist essentiell für die Aktivität der Kinase. Dieses phosphorylierte Threonin im Aktivierungssegment wird von drei Argininen (pT-Koordination) koordiniert. Das DFG-Motiv vermittelt über die Chelatisierung von zwei Mg^{2+} -Ionen die korrekte Positionierung des ATPs im aktiven Zentrum.

4.4.2 Darstellung und Struktur von Cdk13/CycK und Cdk12/CycK

In diesem Kapitel sollen nun verschiedene, ATP-kompetitive Wirkstoffe für Cdk12/CycK und Cdk13/CycK getestet werden, um bessere und selektivere Inhibitoren der Kinaseaktivitäten von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK zu identifizieren. Dazu wurden die Kinasen unter Verwendung des Baculo-Virus Multigenexpressionssystems Multi Bac^{Turbo} exprimiert, die zur Aktivierung notwendige Phosphorylierung per ESI-MS bestimmt und die Phosphorylierungsspezifität der RNAP II CTD mit Hilfe von Western Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern analysiert (Abbildung 4.35). Die Kinasen wurden in den Grenzen Cdk12 714-1063 und Cdk13 694-1039 verwendet die in früheren Arbeiten als aktive Domänengrenzen beschrieben wurden (Bösken et al., 2014, Hönig, 2013).

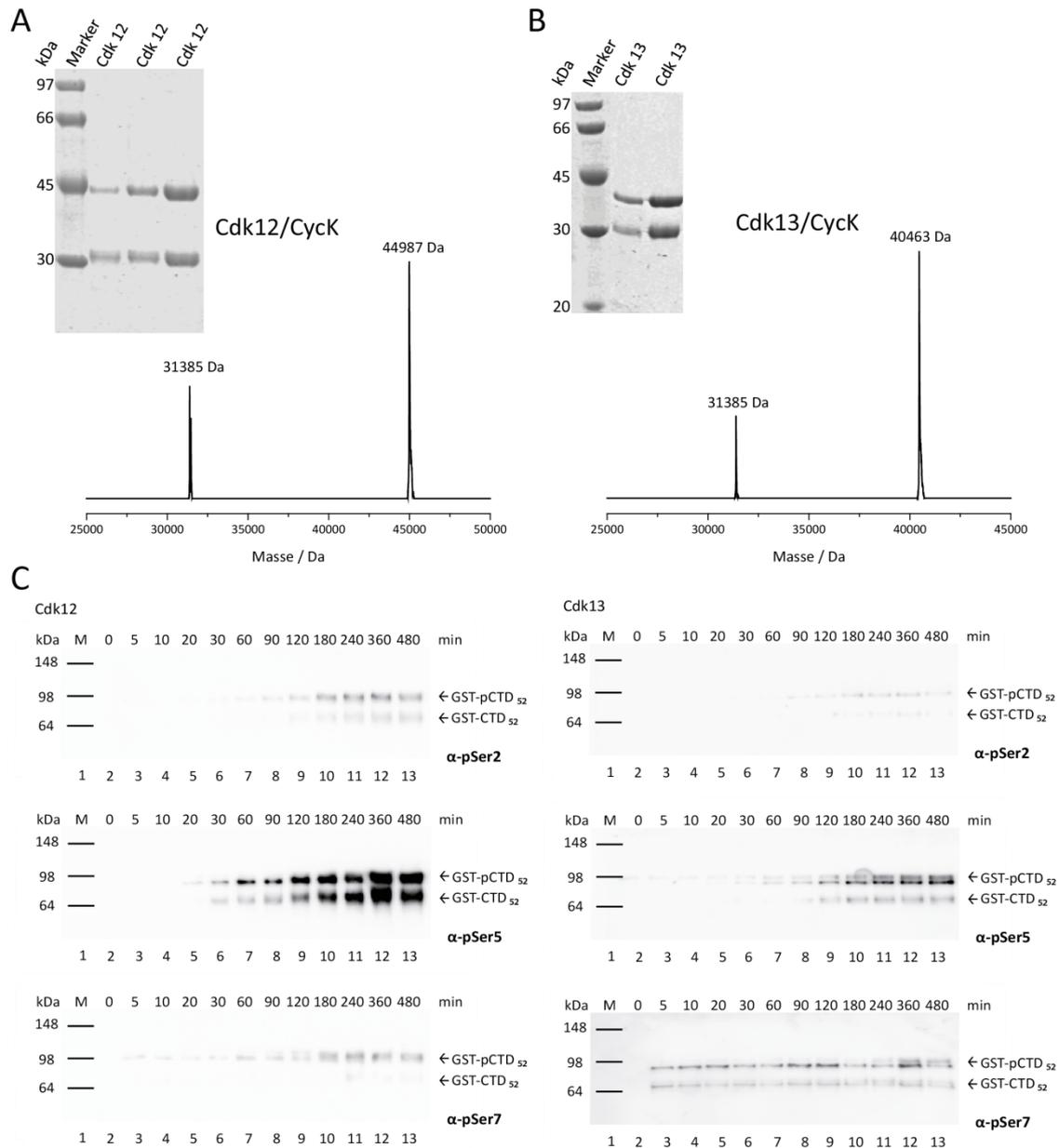


Abbildung 4.35: SDS-PAGE Analysen, ESI-MS Analysen und Western Blots zur Bestimmung der Reinheit und Aktivität von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK

A: SDS-PAGE Analysen von Cdk12/CycK zur Bestimmung der Reinheit und ESI-MS Spektrum des gereinigten Proteinkomplexes zur Bestimmung der Phosphorylierung der Kinase. **B:** SDS-PAGE Gel von Cdk13/CycK zur Bestimmung der Reinheit und ESI-MS Spektrum des gereinigten Proteinkomplexes zur Bestimmung der Phosphorylierung der Kinase. **C:** Western Blot-Analysen zur Bestimmung der Spezifität der Phosphorylierung auf der CTD durch Cdk12/CycK und Cdk13/CycK.

Das MultiBac^{Turbo} System bietet die Möglichkeit, mehrere Gene in einem einzelnen Virus gemeinsam zu exprimieren und erlaubt somit die bestmögliche Produktion von Proteinkomplexen (Bieniossek et al., 2012). Die Cdk12 und Cdk13 Kinasen sind in einem pACEBac1 Akzeptorvektor mit einem N-terminalen GST-Affinitätsanker und einer TEV-Protease-Schnittstelle kloniert. CycK wies ebenfalls einen N-terminalen GST-Affinitätsanker mit einer TEV-Schnittstelle auf. CycK in dem Donorvektor pIDK und Cak1

in dem Donorvektor pIDC wurden mit den Cdk Konstrukten per *in vitro*-Cre-LoxP-Reaktion von Herrn Dr. Christian Böskens und Frau Dana Hönig fusioniert. Die Generierung der Baculoviren, die Überexpression der Proteine in *Sf9*-Insektenzellen und die Reinigung über GST-Affinitätschromatographie mit anschließender Größenausschlusschromatographie wurden nach Protokoll von Herrn Dr. Christian Böskens durchgeführt. In Abbildung 4.35 A und Abbildung 4.35 B sind die Reinheit und die Homogenität der Proteinkomplexe von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK mittels SDS-PAGE dargestellt. Sie zeigen einen stöchiometrischen Komplex mit einer Reinheit von über 95 %. Die Massen der Proteinkomplexe wurden per ESI-MS ermittelt. Sie ergaben für Cdk12/CycK eine Masse von 44.987 Da für Cdk12 und 31.385 Da für CycK (Abbildung 4.35 A). Die detektierte Abweichung von 82 Da für Cdk12 ist auf die Phosphorylierung im Aktivierungssegment zurückzuführen. Die Analyse des Cdk13/CycK Komplexes per ESI-MS ergab eine Masse von 40.463 Da für Cdk13 und von 31.385 Da für CycK (Abbildung 4.35 B). Dies deckt sich ebenfalls mit den berechneten Massen und zeigt für Cdk13 die spezifische 80 Da große Abweichung, die der Phosphorylierung entspricht. Eine homogene Phosphorylierung beider Cdk Untereinheiten konnte untersucht werden. Des Weiteren sollte die Spezifität der Kinasen mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abbildung 4.35 C und D). Dafür wurde wie zuvor die GST-CTD mit 52 Heptawiederholungen in einer Reaktion mit den jeweiligen Kinasen inkubiert, die Reaktion zu den genannten Zeitpunkten mit EDTA abgestoppt und im Western-Blot mit CTD-Antikörpern gegen die Serin Phosphorylierung untersucht. Hier zeigt sich für beide Kinasen eine Ser5 Phosphorylierung. Die Aktivität von Cdk12/CycK scheint dabei aber deutlich höher zu sein als die von Cdk13/CycK. Daneben wurden Ser2 und Ser7 Phosphorylierungen identifiziert, jedoch wurden hier nur schwache Phosphorylierungen detektiert.

Die Kristallstruktur von Cdk13/CycK wurde von Frau Dana Hönig gelöst und wurde in dieser Studie weiter verfeinert und näher untersucht. Der in der Elektronendichte identifizierte Proteinkomplex umfasst die Aminosäuren von Cdk13 695-1024 (Δ 776-784), sowie die Aminosäuren von Cyclin K 21-262. Es befinden sich zwei Cdk13/CycK Komplexe in der asymmetrischen Einheit, von denen die Struktur der Moleküle A und B aufgrund ihrer besseren Vollständigkeit für alle weiteren Modelle verwendet wurden. Die Visualisierung der Struktur und aller nachfolgenden Modelle erfolgte durch das Programm PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, LLC). Zunächst wurde die Gesamtstruktur der aktiven Konformation von Cdk13/CycK dargestellt (Abbildung 4.36).

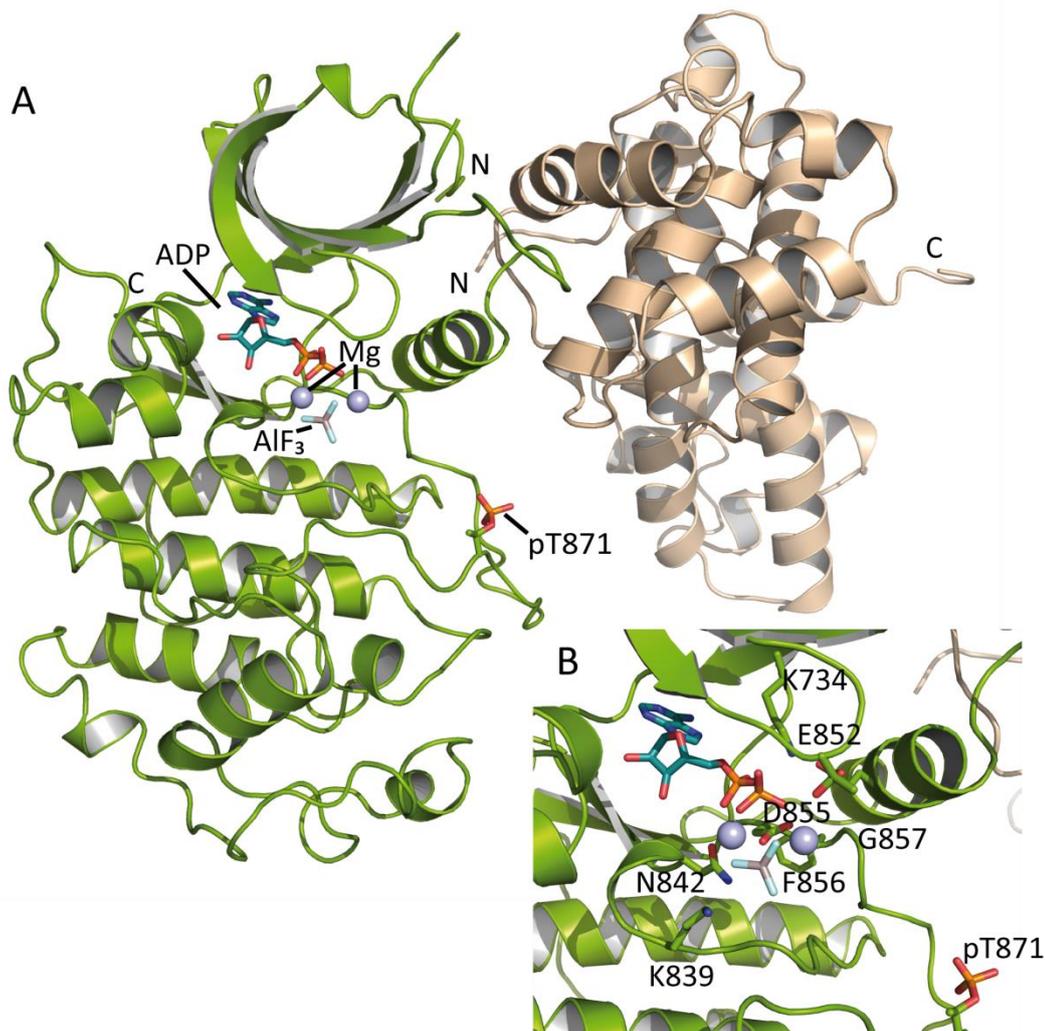


Abbildung 4.36: Kristallstruktur des Cdk13/CycK-Komplexes

A: Cdk13 ist in grün (*splitpea*) und CycK in sand/beige (*wheat*) dargestellt. Das gebundene ADP Nukleotid im aktiven Zentrum der Kinase und das phosphorylierte Threonin pT871 im Aktivierungssegment sind hervorgehoben. Zudem sind die für Aktivität benötigten Magnesiumionen und AlF_3 eingezeichnet. **B:** Detailansicht der ATP-Bindetasche, alle im Text beschriebenen Reste sind zur Übersicht eingezeichnet.

Die Kinasedomäne von Cdk13 weist die typische Kinasefaltung auf. Während der N-terminale Flügel (694-794) hauptsächlich aus β -Faltblättern und einer α C-Helix besteht, setzt sich der C-terminale Flügel (795-998) aus α -Helices zusammen. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den beiden Flügeln in der sogenannten *Hinge*-Region (Abbildung 4.36 A). Innerhalb der α C-Helix befindet sich das konservierte PITAIRE-Motiv. Diese α C-Helix des N-terminalen Flügels ist nach innen geklappt, was charakteristisch für die aktive Konformation der Kinasen ist. So kann die Aminosäure Glu752 aus der PITAIRE-Helix mit dem Lys734 aus dem N-terminalen Flügel interagieren. Durch dieses Zusammenspiel wird das DFG-Motiv im Aktivierungssegment in die richtige Position gebracht, was den Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht. Durch den Einsatz von Aluminiumfluorid,

Magnesiumchlorid, ADP und einem Substratpeptid der CTD, das aber nicht in der Elektronendichte des Kristalls zu sehen ist, wurde der Übergangszustand von ATP imitiert (Abbildung 4.36 B). Die beiden Magnesiumionen im aktiven Zentrum werden von dem Aspartat D855 des DFG Motives stabilisiert. Das MgII liegt in einer oktahedralen Geometrie vor und wird zusätzlich von dem Asparagin N842, den α - und β -Phosphatgruppensauerstoffen, einem AlF_3 Fluoratom und einem Wasser koordiniert. Das Asn842 ist daher nicht nur an der Koordination des Magnesiums beteiligt, sondern auch in der exakten Ausrichtung der α - und β -Phosphate des Nukleotids involviert. Das MgI ist weniger gut eingebunden, liegt aber an derselben Position wie es auch in Strukturen der Proteinkinase A (Madhusudan et al., 2002) und Cdk2 (Bao et al., 2011) ermittelt wurde. Der Übergangszustand während der Katalyse wird zusätzlich durch das Lys839 stabilisiert. Die Glycin-reiche Schleife $^{712}\text{GEGTYG}$ fungiert als eine Art Deckel bei der ATP Bindung und koordiniert durch die Interaktion mit dem Threonin T715 und des β -Phosphates die Stabilisierung der ATP Konformation. Das CycK nimmt eine klassische Cyclinfaltung mit zwei kanonischen Cyclin-Boxen und zwei N- und C-terminal lokalisierten Helices ein. Die C-terminale Region des Cyclin beinhaltet viele Proline und Glutamine und wurde daher zur Kristallisation nicht verwendet. Außerhalb der typischen Cyclin Boxen unterscheiden sich CycA und CycK in der Länge und der Orientierung. Die Orientierung des CycK ist um 21° rotiert im Vergleich zu den Cdk/Cyc Komplexen, welche in der Zellzykluskontrolle involviert sind (Abbildung 4.37).

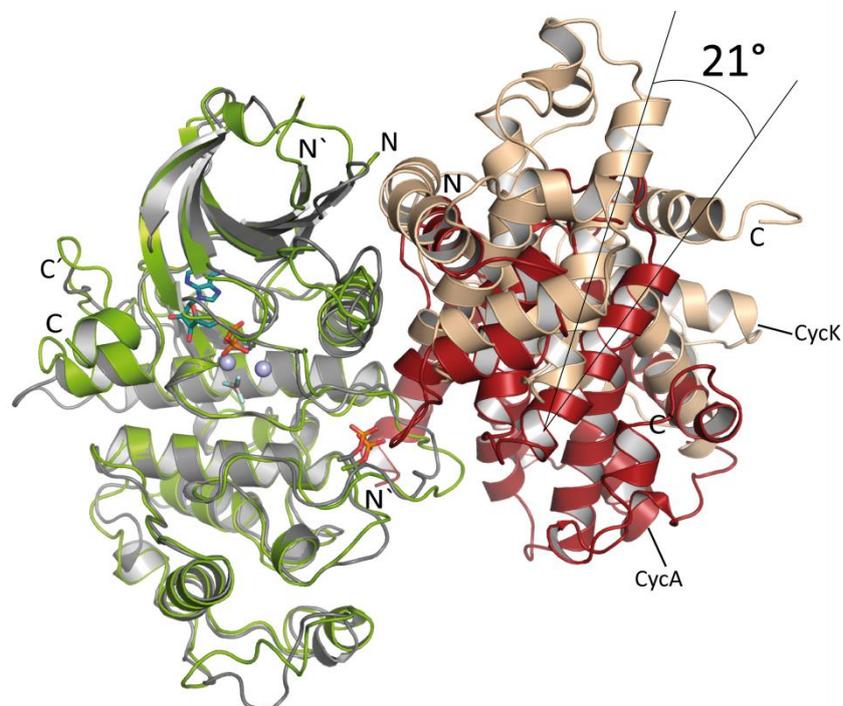


Abbildung 4.37: Überlagerung der Cdk13/CycK und Cdk2/CycA Strukturen

Im Vergleich zu dem Zellzyklus Cdk2/CycA Komplex (grau/rot, PDB: 1JST) ist die Orientierung der CycK-Untereinheit (sand/beige, *wheat*) relativ zur Cdk13-Kinaseuntereinheit um 21° gedreht. Die Überlagerung wurde auf der Kinase-Untereinheit durchgeführt.

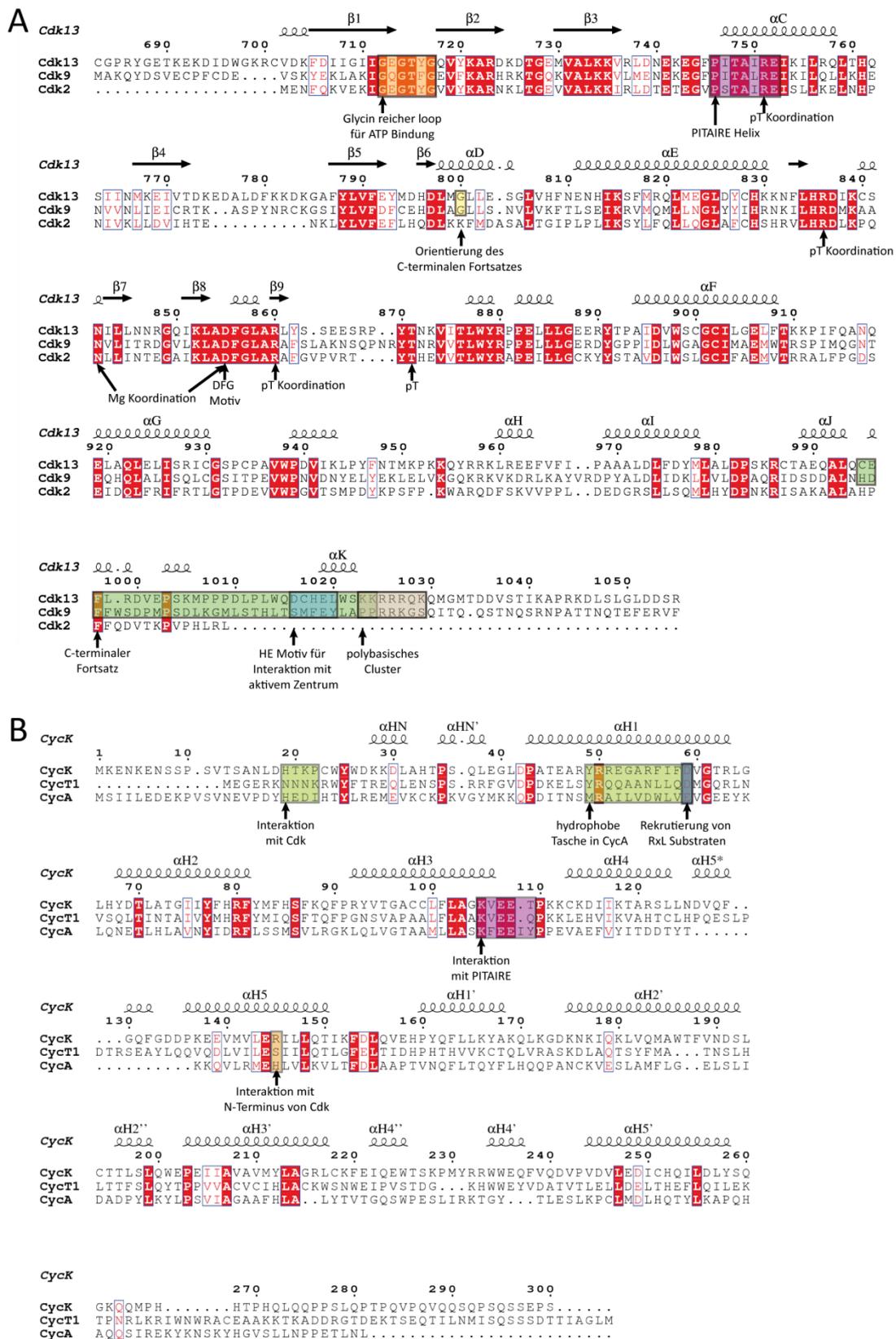


Abbildung 4.38: Sequenzalignment ausgewählter Cdk/Cyclin Paare
A: Sequenzalignment von Cdk13, Cdk9, Cdk2. **B:** Sequenzalignment von CycK, CycT1 und CycA, eingezeichnet sind alle wichtigen Strukturmodule und Interaktionspositionen.

Ähnlich wie bei P-TEFb ist die Anordnung der CycK-Untereinheit relativ zur Cdk13-Untereinheit gegenüber Cdk2/CycA um 21° rotiert. Das CycK unterscheidet sich in Länge und Orientierung der N- und C-terminalen Helices HN und HN' von dem CycA, das eine Rolle in der Zellzykluskontrolle einnimmt. Im Vergleich zum Interface von Cdk2/CycA, bei dem beide Flügel der Kinase und die erste Cyclinbox involviert sind, ist bei Cdk13/CycK nur der N-terminale Flügel beteiligt. Dabei ist die Interaktionsfläche zwischen Cdk13 und CycK jedoch deutlich größer als die von Cdk9/CycT1, was auf die Interaktion der N-terminalen Region von CycK (19-22) mit dem N-terminalen Flügel der Kinase zurückzuführen ist. Bei dieser Interaktion sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem zweiten Glutamat E108 des KVEET-Motives am Ende der Helix 3 des Cyclins und dem PITAIRES-Motiv der Helix der Cdk Untereinheit von Bedeutung. Zudem werden durch das konservierte Arginin R145 der Helix 5 des Cyclins viele Interaktionen mit dem N-terminalen Flügel der Kinaseuntereinheit vermittelt. Dieses Arg ist in anderen Cyclinen nicht konserviert und könnte für die spezifische Erkennung der Komplexformierung verantwortlich sein. Eine polare Sequenz in CycK $^{49}\text{YRREGARFIFD}^{59}$ befindet sich anstelle der für CycA typischen hydrophoben Tasche mit der charakteristischen Sequenz $^{210}\text{MRAILVDWxxE}^{220}$. Dabei entspricht die Position D59 in CycK der Rekrutierungsstelle E220 in CycA für das RxL-Motiv in Substraten und dem p27^{Kip1} Inhibitor (Brown et al., 1999; Cheng et al., 2006; Russo et al., 1996a). Diese Position könnte in CycK für die Wechselwirkungen mit regulatorischen Faktoren verantwortlich sein. Die gleiche Zugänglichkeit dieser Oberflächenstruktur ist beispielsweise in CycT1 nicht gegeben, da vor dem konservierten Aspartat in CycT1 ein Leucin, welches eine starke Interaktion mit der benachbarten Helix H4 eingeht, lokalisiert ist (Anand et al., 2008; Baumli et al., 2008). Diese Unterschiede könnten zur Erkennungsspezifität von Regulationsfaktoren dienen und spezifische Interaktionsflächen darstellen. Für die Aktivität von Cdk13 wird neben der Bindung des Cyclins auch ein phosphoryliertes Threonin an Position T871 im Aktivierungssegment benötigt (Abbildung 4.39).

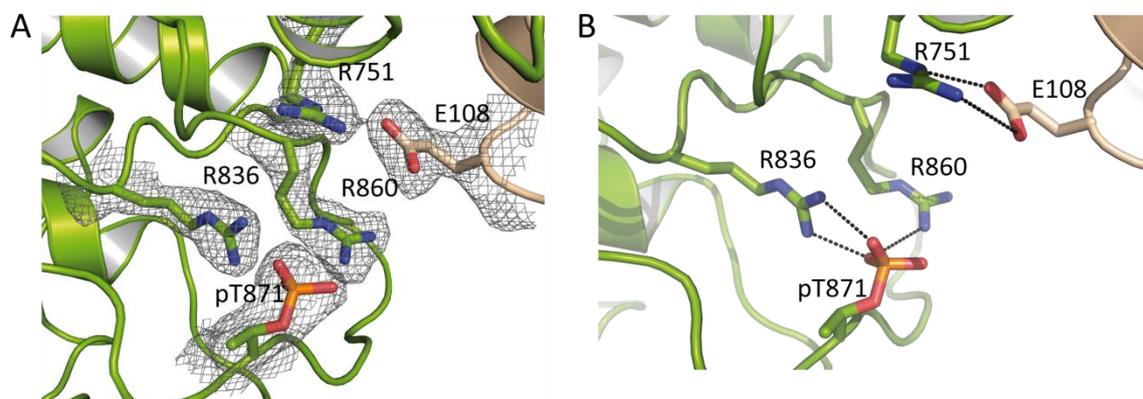


Abbildung 4.39: Detailansicht des pT871 im Aktivierungssegment von Cdk13

A: Elektronendichte der pT871 Koordination. **B:** Nahansicht des pT871 im Aktivierungssegments und Seitenkettenkontakte mit deren Koordination.

Die Elektronendichte für das phosphorylierte Threonin ist klar erkennbar und zeigt die vollständige Aktivierung der Kinase (Abbildung 4.39 A). Die beiden Arginine R836 und R860 interagieren mit dem pT871 durch Salzbrücken. Das dritte kanonische Arginin R751 ist weiter entfernt und interagiert mit dem Glutamin E108 der CycK Untereinheit (Abbildung 4.39 B). Als eine Besonderheit in Cdk13, die auch schon für Cdk12/CycK publiziert wurde (Bösken et al., 2014), erstreckt sich ein C-terminaler Helixfortsatz, der an das Nukleotid assoziiert ist (Abbildung 4.40).

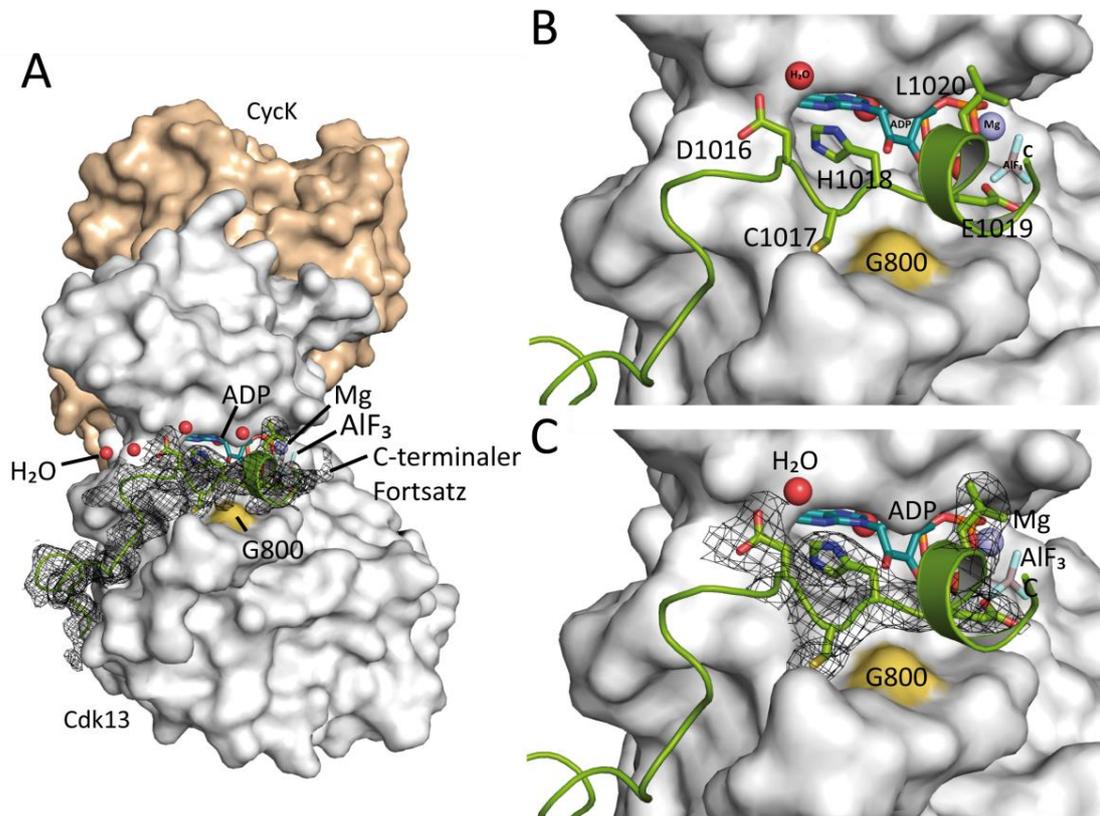


Abbildung 4.40: C-terminaler Fortsatz von Cdk13

A: Oberflächentruktur von Cdk13/CycK (grau/sand) mit der Elektronendichte des C-terminalen Fortsatzes (grün, *splitpea*). **B:** Das DCHEL Motiv im Aktivierungssegment. **C:** Elektronendichte des C-terminalen Kinasefortsatzes. Das ADP ist in *deepteal*, die Wassermoleküle in rot, die Magnesiumionen in *lightblue*, das Aluminiumfluorid in grau und das konservierte Glycin in gelb dargestellt.

Im Anschluss an die C-terminale Helix α J aus der kanonischen Struktur von Cdk13 verläuft eine lange Sequenz (Abbildung 4.40), die sich um den C-terminalen Flügel der Kinase windet und über ein ¹⁰¹⁶DCHEL¹⁰²⁰-Motiv mit dem aktiven Zentrum interagiert. Dieses Motiv interagiert ebenfalls mit dem N- und C-terminalen Flügel der Kinase. Das Aspartat an Position D1016 bildet eine Salzbrücke mit dem Lysin K721, eine polare Wechselwirkung mit dem Tyrosin Y793 und eine wasservermittelte Interaktion mit dem Aspartat D797. Die Wasser vermittelte Wechselwirkungen von E1019 und L1020 mit dem Nukleotid stellen eine schwache Interaktion dar, die vermutlich für den Austausch von ATP zu ADP benötigt wird. Das DCHEL-Motiv initiiert die C-terminale Helix α K und geht über

in das polybasische Cluster 1023 KKRRRQK, das nur teilweise in der Kristallstruktur aufgelöst ist und parallel zur α D Helix des C-terminalen Flügels verläuft. Diese Struktur ähnelt einer "geschlossenen Konformation" für das gebundene Nukleotid in der ATP-Bindetasche der Kinase, sodass der freie Austausch von ADP zu ATP durch die intramolekularen Kontakte der C-terminalen Helix mit der Kinasedomäne beeinträchtigt zu sein scheint. Die Gegenwart der kleinen Aminosäure Glycin G800 (Abbildung 4.39, gelb) in der Helix α D ermöglicht die Orientierung des C-terminalen Fortsatzes. Diese Position ist in Cdk9 und Cdk12 sowohl im Mensch als auch in den Orthologen aus Hefe konserviert. Allerdings ist diese Aminosäure in anderen Cdk-Kinasen, die keinen C-terminalen Fortsatz aufweisen, durch größere Aminosäurereste, wie Lysine, Histidine, Threonine, Valine oder Serine, ausgetauscht. Diese Daten legen nahe, dass der C-terminale Fortsatz einschließlich des polybasischen Clusters ein wichtiges Element für die katalytische Aktivität der Kinase ist. Für die Analyse eines potenten Inhibitors wurde nun zunächst der für die Transkriptionskinasen Cdk9 und Cdk12 potenteste Inhibitor getestet.

4.4.3 Inhibition der transkriptionsregulierenden Kinasen durch Flavopiridol

Flavopiridol wurde als wirksamer Inhibitor von P-TEFb beschrieben. In neueren Studien wurde Flavopiridol auch für die Inhibition von Cdk12/CycK (Bösken, 2013) identifiziert. Dabei inhibiert Flavopiridol Cdk12/CycK aber um ein 10-faches schlechter als P-TEFb. Da jedoch die Inhibition von anderen transkriptionsbezogenen Kinasen durch Flavopiridol nicht ausgeschlossen werden kann, soll nun die Relevanz von Flavopiridol auf anderen Kinasen getestet werden. Cdk9 wird von Cdk7 zur Aktivierung phosphoryliert (Larochelle et al., 2012). Eine Inhibition dieser Kinase durch Flavopiridol würde demnach eine Inhibition der Phosphorylierung von Cdk9 nach sich ziehen und die Aktivierung von Cdk9 beeinträchtigen. Daher könnte es in *in vivo* Studien zu P-TEFb mit Flavopiridol zur einer Inaktivierung von Cdk7 kommen, was zu einer Fehlinterpretation auf molekularer Ebene führen kann. Zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Flavopiridol auf die Transkriptionskinasen Cdk7 und Cdk13 wurde ein radioaktiver Kinaseassay mit Cdk7 auf 100 μ M GST-CTD_{[9]KKK} und Cdk13 auf 100 μ M pS7-CTD_[3] mit jeweils 1 mM ATP über 30 min bei 30 °C verwendet (Abbildung 4.41). Bei einer Kinasekonzentration von 0,2 μ M wurde die Kinaseaktivität bei variierenden Flavopiridolkonzentrationen bestimmt. Die Kinase Cdk7/CycH/MAT1 wurde von der Firma ProQinase (Freiburg) bezogen.

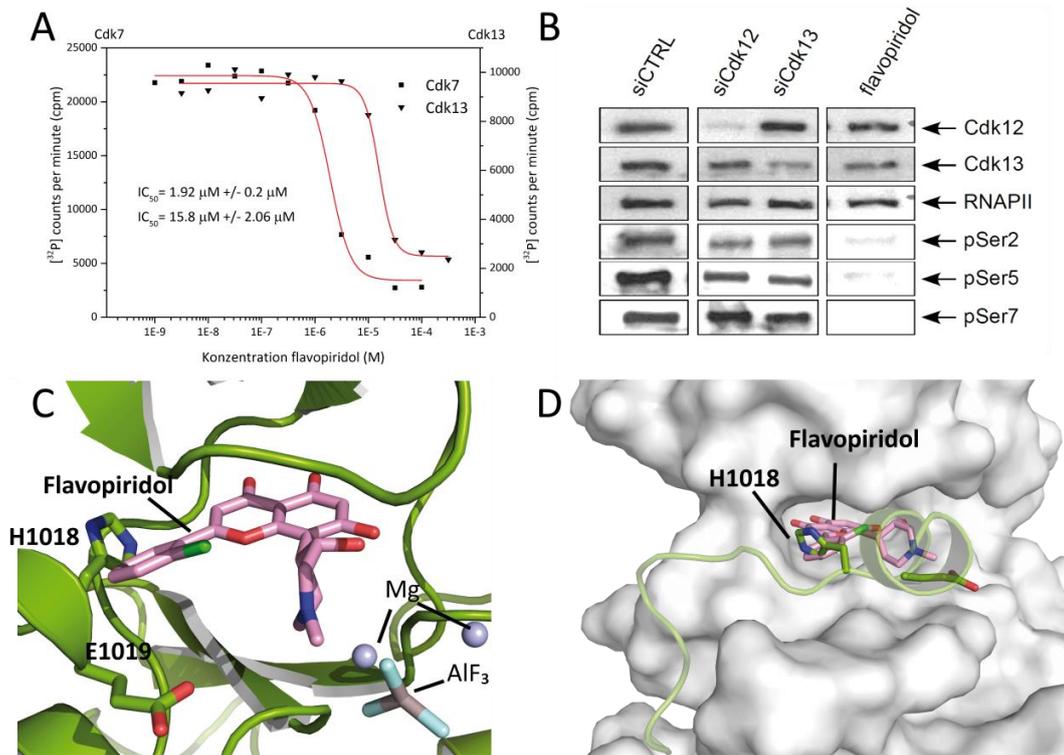


Abbildung 4.41: Bestimmung des IC₅₀ Wertes von Flavopiridol für Cdk7/CycK und Cdk13/CycK

A: Bestimmung der IC₅₀ Werte von Flavopiridol für Cdk7/CycH/MAT1 und Cdk13/CycK. 0,2 μM Kinase, 100 μM Substrat und 1 mM ATP wurden mit einer Konzentrationsreihe von Flavopiridol über 30 min bei 30 °C inkubiert und die Kinaseaktivität bestimmt. **B:** Western Blot-Analyse nach siRNA knockdown von Cdk12 und Cdk13 oder Inkubation mit Flavopiridol. **C, D:** Darstellung von Flavopiridol im aktiven Zentrum von Cdk13. Die Bindung von Flavopiridol im aktiven Zentrum wurde durch die Überlagerung von Cdk9/CycT1•Flavopiridol- (PDB: 3BLR; Baumli et al., 2008) mit der Cdk13/CycK Struktur modelliert.

Der IC₅₀ Wert wurde für Cdk7 mit 2,28 μM bestimmt (Abbildung 4.41 A). Es zeigte sich, dass Flavopiridol ein etwa zehnmal besserer Inhibitor für Cdk9 ist als für Cdk7. Hier wurde ein IC₅₀ Wert von 0,144 μM ermittelt (Bösken, 2013). Anhand dieser Daten kann gezeigt werden, dass Flavopiridol auch die Cdk7 Kinase inhibiert, die P-TEFb phosphoryliert und damit aktiviert. Somit kann Flavopiridol auf die komplette Transkriptionselongation wirken. Für Cdk13 wurde eine schwächere Inhibitionswirkung von 16,1 μM bestimmt. Hier scheint Flavopiridol, wie auch bei Cdk12/CycK, nicht optimal zu wirken.

Die Daten demonstrieren, dass eine generelle Wirksamkeit von Flavopiridol auch für andere Transkriptionselongationskinasen besteht. In Abbildung 4.41 B wurde in Zusammenarbeit mit Mgr. Dr. Dalibor Blazek von der Masaryk Universität in Brno, Tschechien, in *in vivo* Studien der Inhibitor Flavopiridol getestet. Dazu wurde ein siRNA Knockdown Experiment über 72 Stunden von Cdk12 und Cdk13 durchgeführt. Anschließend wurden die HCT116 Zellen für 2 Stunden mit Flavopiridol in einer Konzentration von 500 nM behandelt. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen ohne Flavopiridol über die gleiche Zeit inkubiert und die RNAP II dargestellt. Zudem wurde die Phosphorylierung der Kinasen mit spezifischen Antikörpern gegen pSer2, pSer5 und pSer7 überprüft. Man kann keine deutliche Abnahme

der Banden nach Behandlung mit Flavopiridol erkennen. Dies lässt auf eine potente, breitbandige Inhibition durch Flavopiridol, die auch in *in vitro* Experimenten gezeigt wurden, schließen. Nach Inkubation mit Flavopiridol blieb eine Phosphorylierung der RNAP II CTD aus. Die RNAP II wurde nicht beeinträchtigt, allerdings konnte keine Phosphorylierung der Serine festgestellt werden. Die Hypothese, dass durch Flavopiridol neben P-TEFb auch andere Transkriptionskinasen gehemmt werden, konnte dadurch bestätigt werden. Die für die Aktivität der RNAP II notwendige Phosphorylierung blieb aus. Aufgrund der 100-fach schlechteren Wirkung von Flavopiridol auf Cdk13 im Vergleich zu Cdk9 wurde ein Strukturmodell für die Bindung von Flavopiridol in das aktive Zentrum der Cdk13 Kinasen modelliert (Abbildung 4.41 C und D). Die Bindung von Flavopiridol im aktiven Zentrum wurde durch die Überlagerung von Cdk9/CycT1•Flavopiridol- (PDB: 3BLR; Baumli et al., 2008) mit der Cdk13/CycK Struktur modelliert. Die geringere Inhibition könnte eine mögliche Ursache in der lokalen Überschneidung von Flavopiridol mit dem C-terminalen Fortsatz haben, welche die Affinität von Flavopiridol zur ATP-Bindungstasche herabsetzen. Das DCHEL-Motiv von Cdk13, insbesondere das HE-Motiv an Position 1018-1019 gefolgt von einem polybasischen Cluster, ist essentiell für die Aktivität der Kinase. Anhand der Struktur kann man deutlich erkennen, dass das Histidin die Bindung von Flavopiridol stört. Das könnte eine geringere Affinität von Flavopiridol für Cdk13/CycK im Gegensatz zu P-TEFb erklären. Flavopiridol wird standardmäßig für die Inhibition von P-TEFb verwendet, wirkt aber nicht exklusiv auf diese Kinase. Daher könnten früheren Studien zur Inhibition von P-TEFb falsche Rückschlüsse bezüglich der tatsächlichen Aktivität von P-TEFb geführt haben. Unter Einbindung der strukturellen Elemente des C-terminalen Fortsatzes, einer spezifischen Verdrängung der Wassermoleküle und einer Homologie zu Flavopiridol sollen nun die beiden Inhibitoren Thalidomid und Lenalidomid getestet werden, die Cdk12 und Cdk13 möglicherweise inhibieren könnten.

4.4.4 Analyse der Inhibition von Transkriptionselongationskinasen

Die Strukturen der getesteten Cdk-Inhibitoren sind in Abbildung 4.41 dargestellt und wurden mit dem Programm ChemDraw generiert.

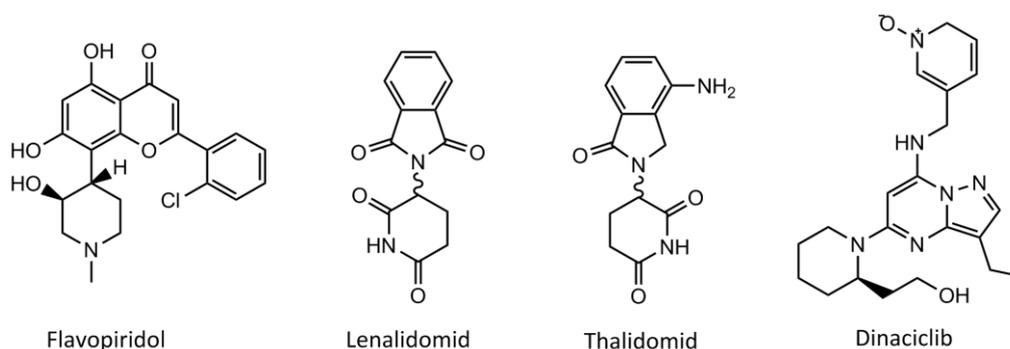


Abbildung 4.42: Strukturen der Inhibitoren Flavopiridol, Lenalidomid, Thalidomid und Dinaciclilb
Die gezeigten Strukturen wurden mit dem Programm ChemDraw generiert.

Es wurde ein radioaktiver Kinaseassay mit 0,2 μM Cdk12/CycK oder 0,2 μM Cdk13/CycK mit einem 10-fachen und 100-fachen Überschuss der Inhibitoren durchgeführt und deren Potenz im Kinaseassay überprüft (Abbildung 4.43).

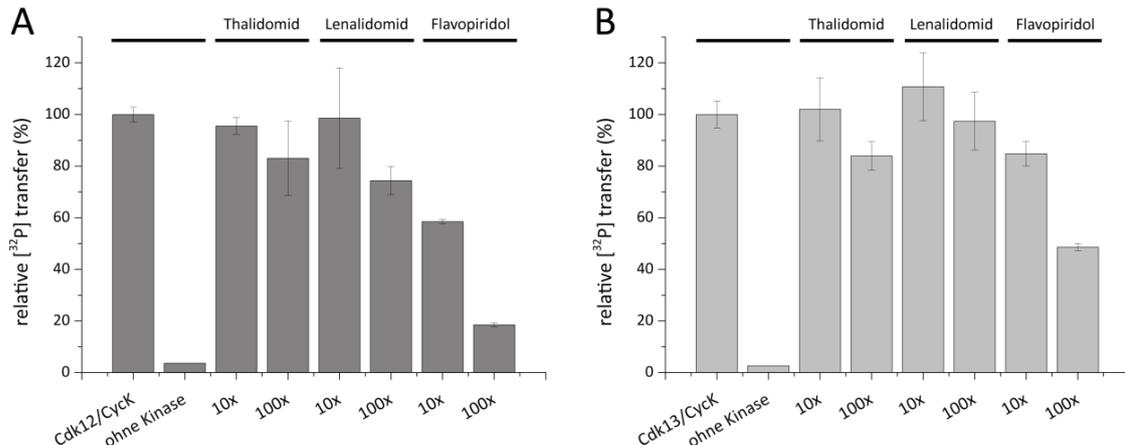


Abbildung 4.43: Inhibition der Transkriptionelongationskinasen mit verschiedenen Wirkstoffen

A: Inhibition von Cdk12/CycK, 100 μM pS7-CTD_[3], 1 mM ATP und 0,2 μM Cdk12/CycK bzw. **B:** Cdk13/CycK wurden entsprechend der Darstellung mit 10- bzw. 100-fachem Überschuss verschiedener Inhibitoren für 60 min bei 30 °C inkubiert und die Kinaseaktivität bestimmt.

Als Positivkontrolle für diese Messungen diente ein Ansatz ohne Inhibitor und als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Kinase. Der Wert mit der Kinase ohne Inhibitor wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte dazu berechnet. Ein zehnfacher Überschuss des Inhibitors sowohl von Thalidomid als auch Lenalidomid konnte keine reduzierende Wirkung auf die Aktivität der Kinasen aufweisen. Bei einem 100-fachen Überschuss wurde die Kinaseaktivität von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK auf 80 % gedrosselt. Im Vergleich zu Flavopiridol handelt es sich bei Thalidomid und Lenalidomid aber um schlechtere Inhibitoren. Aufgrund dieser schlechten Inhibition durch die Wirkstoffe wurden diese nicht weiter untersucht.

In freundlicher Zusammenarbeit mit Geoffrey Shapiro und Shawn Johnson vom Dana-Farber Cancer Instituts an der Harvard Universität (Boston) wurden wir auf den Inhibitor Dinaciclib aufmerksam (Abbildung 4.42). Dinaciclib wurde als erstes in einem *compound screen* in einem Maus-Xenograft-Modell, mit Flavopiridol als Referenz gefunden (Parry et al., 2010) und als potenter kleiner Inhibitor für Cdk1 (IC_{50} : 3 nmol/L), Cdk2 (IC_{50} : 1 nmol/L), Cdk5 (IC_{50} : 1 nmol/L) und Cdk9 (IC_{50} : 4 nmol/L) beschrieben (Paruch et al., 2010). Dinaciclib wurde in klinischen Studien für verschiedene Krebsindikationen evaluiert (Bose et al., 2013). Zudem interagiert Dinaciclib mit acetylierten Lysinen von Bromodomänen (Martin et al., 2013). Dabei werden die Erkennungsstellen, die durch ungefaltete Proteine (UPR, engl.: *unfolded protein response*) gebunden werden, durch einen Cdk1 und Cdk5 abhängigen Mechanismus inhibiert (Nguyen and Grant, 2014).

In dieser nachfolgenden Studie soll Dinaciclib auf seine Fähigkeit verschiedene Kinasen auf der CTD der RNAP II zu inhibieren, getestet werden. Dazu wurde der radioaktive Kinaseassay genutzt (Abbildung 4.43).

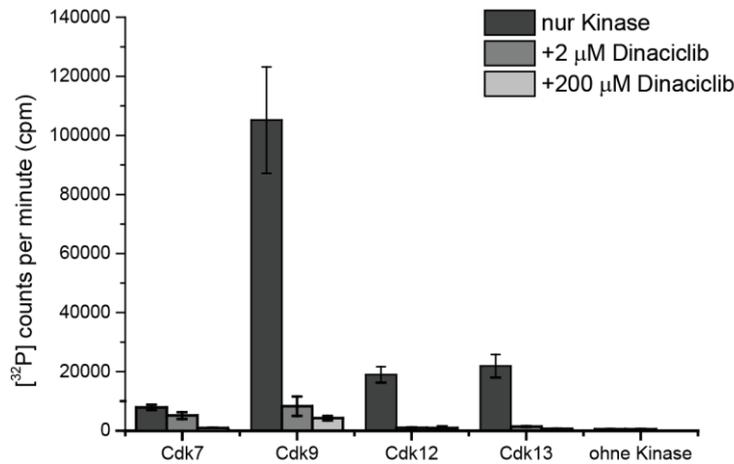


Abbildung 4.44: Inhibition von Transkriptionselongationskinasen mittels Dinaciclib

Inhibition der Aktivität von 0,05 µM Cdk7/CycH/MAT1, 0,2 µM Cdk9/CycT1, 0,2 µM Cdk12/CycK und 0,2 µM Cdk13/CycK auf pS7-CTD_[3] mit 10-fachem und 1000-fachem Überschuss Dinaciclib.

Zunächst wurden 0,2 µM Kinase bzw. 0,05 µM Cdk7, 100 µM pS7-CTD_[3] mit einem 10- (bzw. 40-)fachen und 1000- (bzw. 4000-)fachen Überschuss von Dinaciclib über eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Man kann eine deutliche Reduzierung der Aktivität bei Cdk7/CycH und Cdk9/CycT1 erkennen. Eine vollständige Inhibition wird allerdings erst bei Zugabe von 200 µM Dinaciclib erreicht. Cdk12/CycK und Cdk13/CycK werden schon durch Zugabe von 2 µM Dinaciclib vollständig inhibiert. Dinaciclib ist somit ein potenter Inhibitor für die Cdk's *in vitro*.

Flavopiridol ist ein potenter ATP-kompetitiver Inhibitor für Cdk9 (Baumli et al., 2008; Chao et al., 2000). Für Cdk12 ist Flavopiridol bis heute als bester Inhibitor beschrieben mit einem IC₅₀ Wert von 1,37 µM. Auf der Cdk12 Kinase wirkt er 10-fach schlechter als auf Cdk9, mit einem IC₅₀ Wert von 0,144 µM (Bösken et al., 2014). Die Daten demonstrierten die hohe Spezifität von Flavopiridol für Cdk9, machen aber auch deutlich, dass offensichtlich eine breitbandige Wirksamkeit auch gegen andere Transkriptionselongationskinasen besteht. Zudem konnte eine sterische Überlappung in der aktiven Bindetasche von Cdk12 und Cdk13 mit Flavopiridol gefunden werden. Dies zeigt, dass Flavopiridol nicht gut in das aktive Zentrum von Cdk12 und Cdk13 passt und daher die Affinität wohl verringert ist und als Folge dessen keine starke Inhibition vorliegen kann.

Im Vergleich zu Flavopiridol sollen nun die IC₅₀ Werte von Dinaciclib für Cdk9/CycT1, Cdk12/CycK und Cdk13/CycK ermittelt werden. Bei einer Kinasekonzentration von 0,2 µM wurde die Kinaseaktivität bei variierenden Dinaciclib- und Flavopiridolkonzentrationen bestimmt (Abbildung 4.45). Die Fit-Kurven wurden mit dem Programm Origin durchgeführt. Die IC₅₀ Werte sind in Tabelle 4.2 zum besseren Vergleich dargestellt.

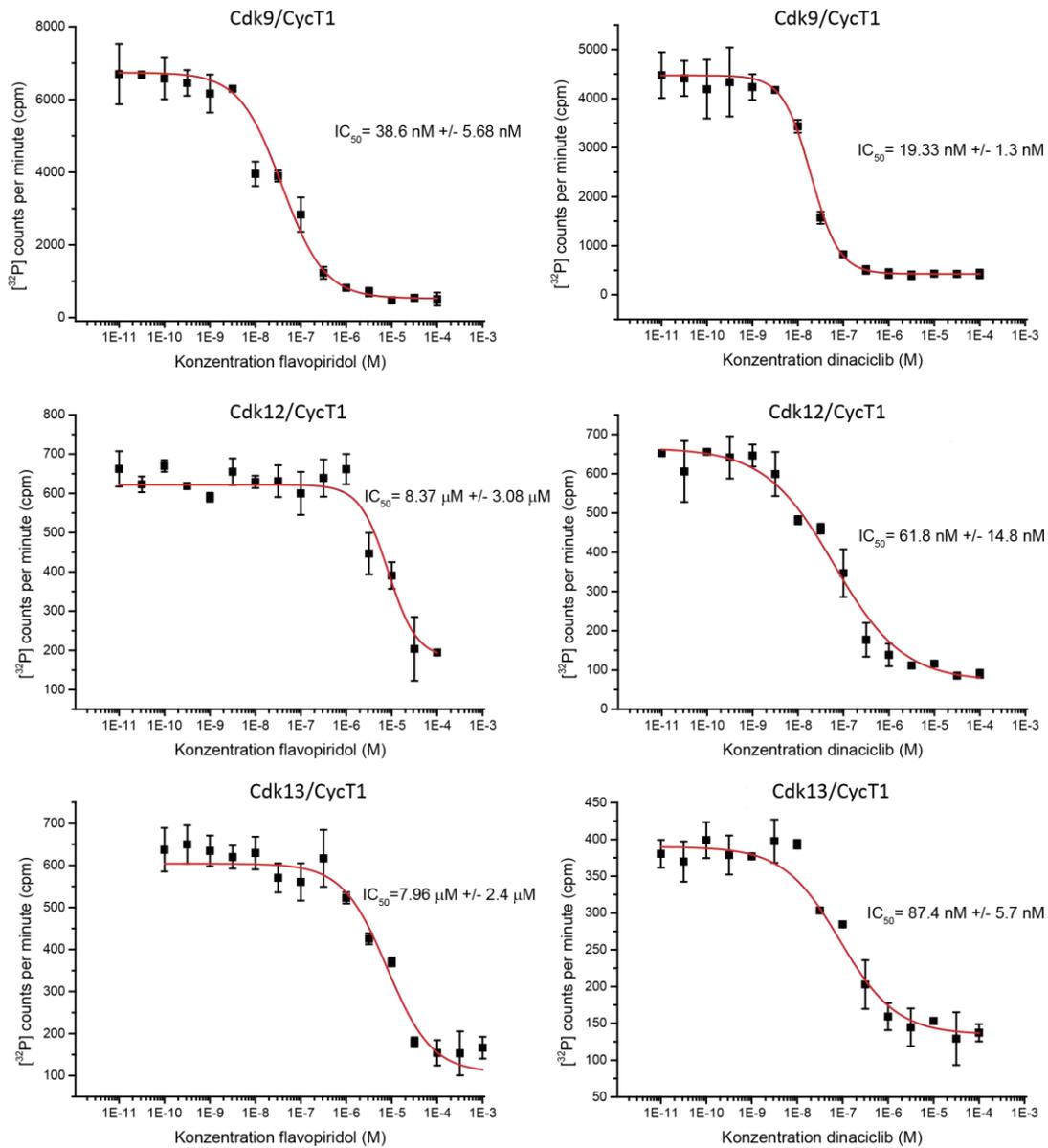


Abbildung 4.45: Bestimmung des IC_{50} von Dinaciclib und Flavopiridol für die Transkriptionselongationskinasen

In einem radioaktiven Kinaseassay wurden 100 μM pS7-CTD_[3] Substrat, 1 mM ATP und 0,2 μM Kinase (Cdk9/CycT1 bzw. Cdk12/CycK bzw. Cdk13/CycK) mit verschiedenen Konzentrationen von Flavopiridol (links) und Dinaciclib (rechts) verwendet.

Tabelle 4.2: IC_{50} Werte von Cdk9/CycT1, Cdk12/CycK und Cdk13/CycK auf pS7-CTD_[3] mit dem Inhibitor Dinaciclib

Kinase	Inhibitor	IC_{50} Wert
Cdk9/CycT1	Flavopiridol	38,6 nM \pm 5,7 nM
	Dinaciclib	19,3 nM \pm 1,3 nM
Cdk12/CycK	Flavopiridol	8.400,0 nM \pm 3.080,0 nM
	Dinaciclib	61,8 nM \pm 14,8 nM
Cdk13/CycK	Flavopiridol	8.000,0 nM \pm 2.400,0 nM
	Dinaciclib	87,4 nM \pm 5,7 nM

Für Cdk9/CycT1 wurde eine doppelt so starke Inhibition durch Dinaciclib erreicht wie durch Flavopiridol. Die IC_{50} Werte für die Inhibition durch Flavopiridol ist für Cdk12/CycK und Cdk13/CycK sehr ähnlich. Ebenso ähneln sich die Inhibitionswerte durch Dinaciclib von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK. Flavopiridol inhibiert hier Cdk12/CycK und Cdk13/CycK 500-fach schlechter als Cdk9/CycT1. Allerdings kann durch Dinaciclib eine sehr starke Inhibition erreicht werden mit einem IC_{50} Wert von 61,8 nM für Cdk12/CycK und 87,4 nM für Cdk13/CycK. Diese Inhibitionswirkung entspricht einer ähnlichen Größenordnung wie der durch Flavopiridol auf Cdk9/CycT1. Dabei zeigte sich, dass Dinaciclib ein etwa dreifach besserer Inhibitor für Cdk9/CycT1 ist als für Cdk12/CycK und Cdk13/CycK.

Um die Bindung von Dinaciclib in das aktive Zentrum von Cdk13 zu veranschaulichen, wurde ein Modell erstellt. Vor kurzem wurde eine Kristallstruktur von Cdk2 mit Dinaciclib gelöst (Martin et al., 2013). Die Bindung von Dinaciclib im aktiven Zentrum wurde durch die Überlagerung von Dinaciclib•Cdk2 (PDB: 4KDI) mit der Cdk13/CycK Struktur modelliert (Abbildung 4.46).

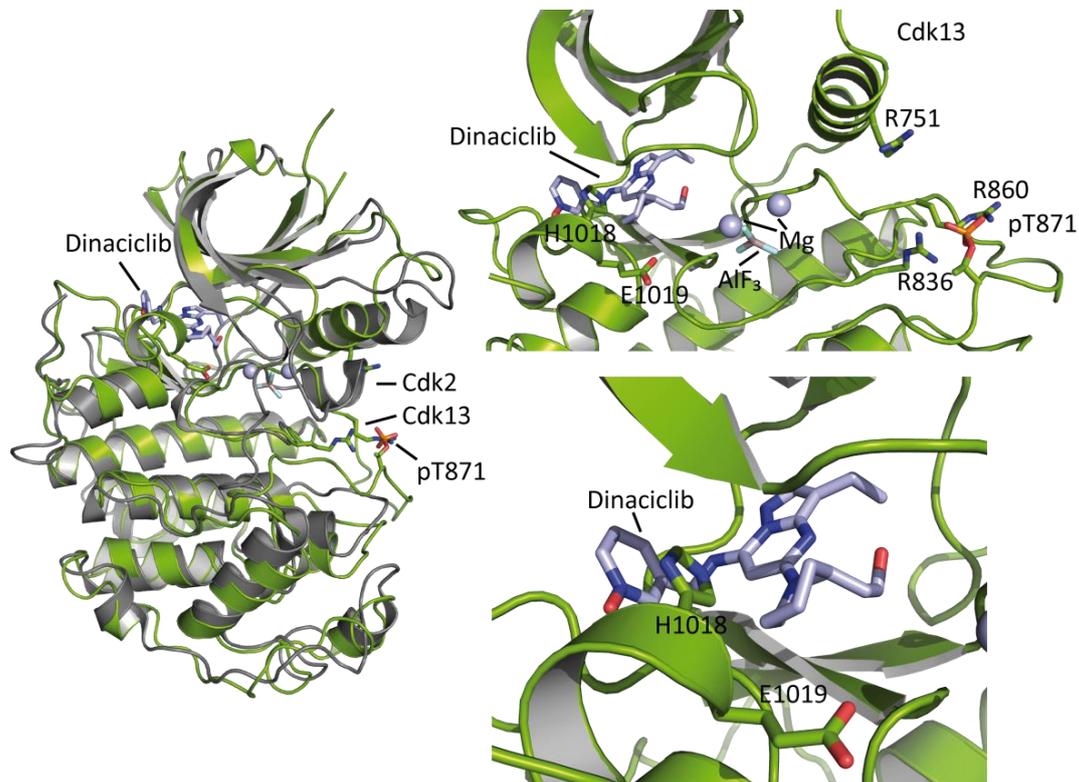


Abbildung 4.46: Sequenzüberlagerung von Cdk2 und Dinaciclib mit Cdk13

Cdk2 wurde mit Dinaciclib kristallisiert (PDB: 4KDI; Martin et al., 2013) und soll hier den Fit ins aktive Zentrum von Cdk13 zeigen.

Im Vergleich zu Flavopiridol konnte für die Inhibition durch Dinaciclib der Kinase Cdk13/CycK keine sterische Hinderung mit dem Histidin im C-terminalen Fortsatz gefunden werden. Eine leichte Drehung des loops könnte sogar zu einer Verstärkung der Inhibition durch Ausbildung einer π - π -Wechselwirkung führen.

Neben der CTD wurden im Rahmen dieser Arbeit auch andere Proteine untersucht, um zu testen, ob sie als Substrat der Transkriptionskinasen dienen können. c-Abl stellt in diesem Zusammenhang eine bekannte Kinase dar, die c-Myc phosphorylieren kann und soll als nächstes in Verbindung mit der Isomerase Pin1 auf ihre Aktivität hin untersucht werden.

4.5 c-Abl und Pin1

Die humane Peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 (engl.: *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*) isomerisiert selektiv Proline unmittelbar nach einem phosphorylierten Serin oder Threonin (Lu et al., 2007). Die Isomerisierung führt zu einer Konformationsänderungen, die die Aktivität auf den Substraten modulieren kann. Pin1 reguliert eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, wie p53, p73, c-Jun und c-Fos (Mantovani et al., 2004; Mantovani et al., 2007; Monje et al., 2005). Diese Transkriptionsfaktoren rekrutieren eine Vielfalt von Cofaktoren, einschließlich der Histon-Acetyltransferase p300 (Bitomsky et al., 2004). Pin1 enthält keine Kernlokalisationssequenz oder Exportsignal, seine subzelluläre Verteilung wird nur über die Wechselwirkung mit Substraten und eine WW-Domäne bestimmt. Insbesondere kann die Hochregulierung von Pin1 mit bestimmten Krebsarten in Verbindung gebracht werden und die Herunterregulierung von Pin1 in der Alzheimer-Krankheit (Lu et al., 2007). Inhibitoren von Pin1 könnten therapeutische Zwecke gegen Krebs oder Immunerkrankungen dienen. Zudem führt Pin1 zu einer verbesserten Rekrutierung von p300 durch p53 und p73, was zu einer vermehrten Acetylierung der Transkriptionsfaktoren führt (Mantovani et al., 2004; Mantovani et al., 2007). Bei der Rekrutierung von p73 ist die Tyrosinkinase c-Abl involviert und phosphoryliert p73 als Antwort auf DNA-Schäden. Durch die Aktivierung des p38-Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Weges wird die Phosphorylierung von p73 an Serinen und Threoninen begünstigt. Diese Kette führt zu einer Vielzahl von Abläufen, die in eine verstärkte Transkriptionsaktivität zur Folge haben.

c-Myc ist ebenfalls ein Substrat von Pin1 (Yeh et al., 2004), dabei wird das Prolin an Position 59 neben einem phosphorylierten Threonin an Position 58 von Pin1 isomerisiert. Bei dieser Isomerisierung wird die Phosphatase 2A rekrutiert, wodurch die Dephosphorylierung des benachbarten pSer-Pro Motivs an Position 62-63 erreicht wird und so c-Myc durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut wird (Yeh et al., 2004). p300 stabilisiert c-Myc unabhängig von der Acetyltransferase Aktivität (Faiola et al., 2005) oder acetyliert c-Myc und erhöht so die Transkriptionsaktivität von c-Myc (Adhikary et al., 2005; Faiola et al., 2005; Vervoorts et al., 2003). c-Myc rekrutiert dabei andere Histon-Acetyltransferase-Komplexe zum Chromatin und erhöht die Histon-Acetylierung und Transkription (Frank et al., 2003; Frank et al., 2001; Vervoorts et al., 2003). Interessanterweise stabilisiert die Phosphorylierung der Aminosäurereste Ser62 und Ser71 c-Myc, die wiederum für die c-Myc abhängige Apoptose benötigt wird (Noguchi et al., 2001).

Auf der einen Seite verstärkt c-Abl die Phosphorylierung von c-Myc an Ser62 und Thr58 und die Assoziation mit Pin1 und p300 und die Acetylierung durch p300 (Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013). Auf der anderen Seite interagiert c-Abl mit der C-terminalen Domäne von c-Myc und phosphoryliert bis zu fünf Tyrosinreste am N-terminus von c-Myc, wobei die Position Y74 stark begünstigt ist (Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013). Die phosphorylierte Form von c-Myc an Position Y74 ist im Cytoplasma lokalisiert und korreliert mit der c-Abl abhängigen Aktivierung von Krebs (Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013).

In Abhängigkeit von Pin1 mit und ohne WW-Domäne sollte nun die Phosphorylierung sowohl auf der CTD, als auch auf c-Myc untersucht werden. Dazu wurden in einem radioaktiven Kinaseassay 0,2 μM c-Abl mit 10 μM Pin1, 1 mM ATP und verschiedenen Konzentrationen der Substrate eingesetzt (Abbildung 4.47).

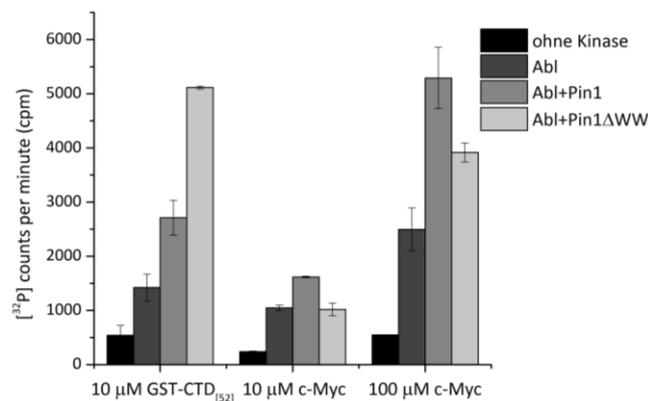


Abbildung 4.47: Bestimmung des Einflusses von Pin1 auf die c-Abl vermittelte CTD und c-Myc Phosphorylierung

0,2 μM Kinase mit 1 mM ATP wurde auf unterschiedliche Konzentrationen der CTD und von c-Myc in Abhängigkeit von 10 μM Pin1 bzw. Pin1 Δ WW getestet.

c-Abl phosphoryliert nicht nur das Substrat c-Myc, sondern auch die CTD der RNAP II. Als Negativkontrollen dienten die jeweiligen Ansätze ohne Kinase. Die Aktivität von c-Abl scheint auf den beiden Substraten annähernd gleich zu sein und kann durch Zugabe einer höheren Konzentration von c-Myc erhöht werden. Die Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 führt sowohl auf der CTD als auch auf c-Myc zu einer Steigerung der Aktivität von c-Abl um etwa das Doppelte. Wider erwartend verstärkt auch Pin1 ohne die WW-Domäne die Aktivität der Kinase auf dem CTD Substrat. Dabei sollte die Bindung an phosphorylierte Serine oder Threonine, die die Aktivität von Pin1 ermöglichen, durch diese Domäne vermittelt werden (Chen and Sudol, 1995). Die Erhöhung der Aktivität von c-Abl auf der CTD in Gegenwart von Pin1 ist deutlich größer als auf dem c-Myc Substrat. Bei der Konzentration 10 μM c-Myc konnte keine Erhöhung der Aktivität festgestellt werden und bei 100 μM c-Myc nur eine geringe. Für c-Myc ist eine Bindung an c-Abl beschrieben worden (Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013), die auch einen Einfluss auf die Interaktion zu Pin1 haben könnte. In weiterführenden Studien z. B. durch *in vivo* Versuchsreihen könnte der Einfluss der WW Domäne auf die CTD näher untersucht werden.

c-Myc konnte vor kurzem in *in vitro* Studien auch als Substrat von P-TEFb identifiziert werden (Bösken, 2013). Dabei soll nun die Fragestellung der Phosphorylierung von c-Myc durch diese und andere Kinasen geklärt werden und die Rolle dieses Transkriptionsfaktors als Regulator der Genexpression, der an der Entstehung von zahlreichen Krebsarten beteiligt ist, näher beschrieben werden.

4.6 c-Myc als Substrat Transkriptionsregulierender Kinasen

Als Genregulatorprotein ist c-Myc an der Rekrutierung von P-TEFb beteiligt und ein wichtiges Element in der Regulation von verschiedenen Zellprozessen (Rahl et al., 2010). Es bindet mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (Mittelstadt et al., 2005) an die Cyclin Boxen von CycT1 (Eberhardy and Farnham, 2002; Kanazawa et al., 2003). In vergangenen Studien konnte nach erfolgreicher Reinigung von c-Myc aus Einschlusskörpern (engl.: *inclusion bodies*) die Phosphorylierung von c-Myc durch P-TEFb gezeigt werden (Bösken, 2013). Da c-Myc mehrere SP Motive und andere mögliche Phosphorylierungsstellen aufweist, soll nun geklärt werden, welche Positionen durch unterschiedliche Kinasen bevorzugt phosphoryliert werden. Dazu wurden sechs potentielle Phosphorylierungsstellen ausgesucht und zu Alanin mutiert. Zudem wurden Konstrukte entworfen, die je nur eine dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen beinhalteten. Die Reinigung wurde von Herrn Dr. Christian Bösken etabliert und nach seinem Protokoll durchgeführt. Die anschließende ESI-MS Messung bestätigte die erfolgreiche Reinigung der Mutanten und des Wiltyps. In Abbildung 4.48 sind die hier verwendeten Expressionskonstrukte dargestellt.

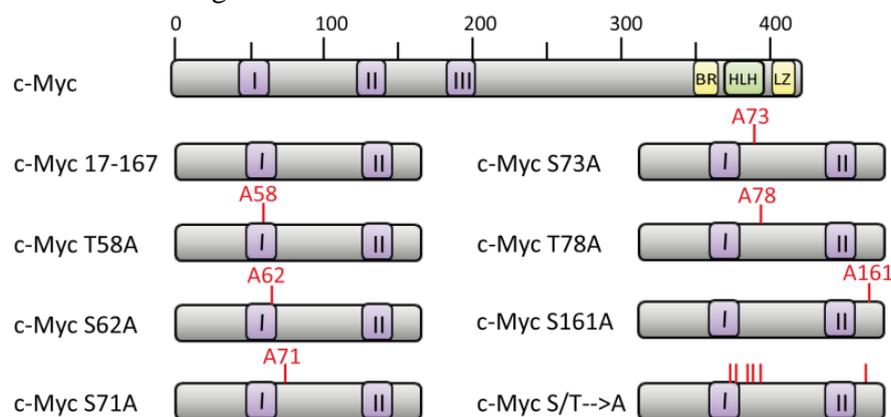


Abbildung 4.48: Schematische Darstellung der Domänenarchitektur des Protoonkogens c-Myc und deren Mutanten

Der N-Terminus von c-Myc umfasst die Transaktivierungsdomäne (TAD; 1-143) mit ihren hochkonservierten Myc-BoxI (45-65) und Myc-BoxII Elementen (128-144, lila) sowie ein weiteres als Myc-BoxIII bezeichnetes konserviertes Motiv. Der C-Terminus enthält die für die Bindung an die DNA und das Partnerprotein Max wichtige *basic-region/helix-loop-helix/leucine-zipper* Domäne (gelb-grün-gelb). Die Interaktion mit P-TEFb wurde für die Myc-BoxI beschrieben. Die für diese Studie generierten Konstrukte und Mutanten der TAD sind schematisch dargestellt (Adhikary and Eilers, 2005).

Zunächst wurde Wildtyp c-Myc verwendet, um verschiedene Kinasen auf ihre Fähigkeit hin, c-Myc als Substrat zu phosphorylieren, zu testen. Dazu wurde ein radioaktiver Kinaseassay herangezogen und die Reaktion für 30 min bei 30 °C durchgeführt. 0,2 µM Kinase, 100 µM c-Myc und 2 mM ATP wurden verwendet (Abbildung 4.49).

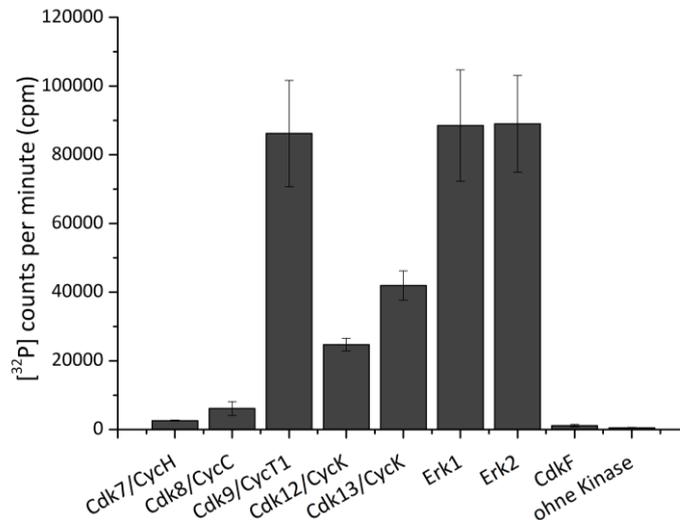


Abbildung 4.49: Vergleich der Aktivität verschiedener Kinasen auf c-Myc

Untersucht wurden Cdk7/CycH/MAT1, Cdk8/CycC, Cdk9/CycT1, Cdk12/CycK, Cdk13/CycK, Erk1, Erk2 und CdkF (*Arabidopsis thaliana*). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Kinase, um eine Kontamination sowohl in der Pufferlösung als auch in der Proteinlösung auszuschließen.

Eine deutliche Phosphorylierung von c-Myc erfolgte durch die MAP Kinasen und P-TEFb. Zudem konnten auch die Transkriptionselongationskinasen Cdk12/CycK und Cdk13/CycK als Phosphorylierungskinasen von c-Myc identifiziert werden. Eine geringere Aktivität zeigte hingegen Cdk8/CycC auf c-Myc. Eine Phosphorylierung durch Cdk7/CycH und CdkF blieb dagegen aus. So scheint das humane c-Myc Protoonkogen ein Substrat für die Transkriptionskinasen zu sein, aber eine unselektive Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen konnte ausgeschlossen werden.

Vor dem Hintergrund dieses neu etablierten Substrats, sollte nun herausgefunden werden, welche Stelle in c-Myc vorrangig von den Transkriptionselongationskinasen phosphoryliert wird. Für die Evaluierung der bevorzugten Phosphorylierungsstellen der Kinasen auf c-Myc wurde im Standardassay 0,2 µM Kinase, 100 µM Substrat über 15 min bei einer Temperatur von 30 °C eingesetzt und die gemessene Radioaktivität des Ansatzes mit Wildtyp c-Myc als Richtwert normiert, während alle weiteren Quantifizierungen relativ zu diesem Wert berechnet wurden (Abbildung 4.50). Außerdem wurde in jedem Assay ein CTD Substrat mit 9 Phosphorylierungsstellen bei gleicher Konzentration verwendet, um die Aktivität der Kinasen auf den verschiedenen Substraten vergleichen zu können.

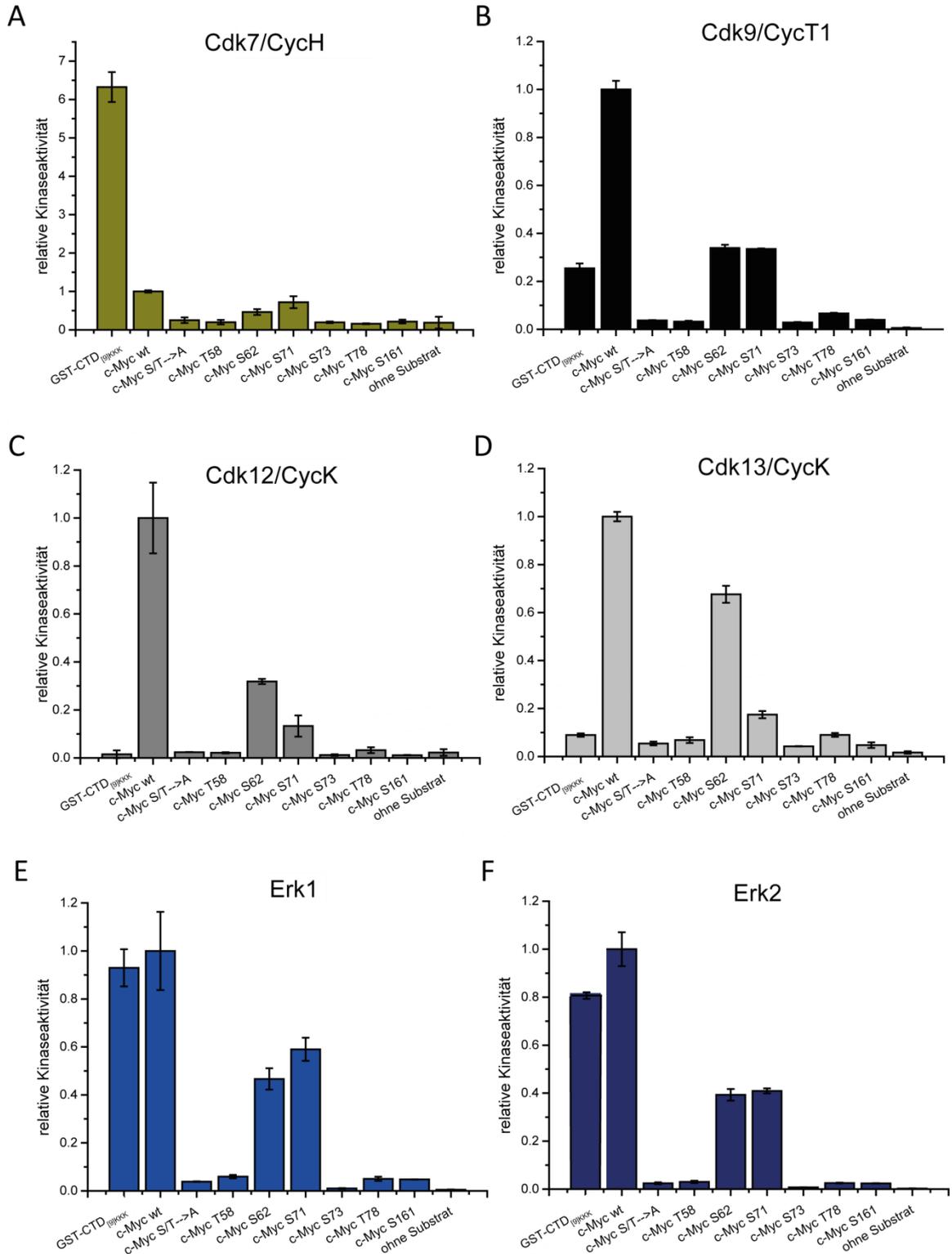


Abbildung 4.50: Phosphorylierung von GST-CTD^{[9]KKK}, c-Myc und der c-Myc Konstrukte
 100 μ M Substrat wurden mit 0,2 μ M der Kinasen **A:** Cdk7/CycH/MAT1, **B:** Cdk9/CycT1, **C:** Cdk12/CycK, **D:** Cdk13/CycK, **E:** Erk1, **F:** Erk2 und 2 mM ATP über 30 min bei 30 °C inkubiert.

Die beiden MAP Kinasen scheinen die gleiche Spezifität für die Phosphorylierungsstelle auf c-Myc zu entfalten. Sie zeigen eine Präferenz für die S62 und S71 Position von c-Myc. Die Phosphorylierung der Position S62 (Alvarez et al., 1991) des Transkriptionsfaktors c-Myc konnte somit bestätigt werden. Die Phosphorylierung von Ser62 führt zu einer Stabilisierung von c-Myc. Die Position S71 wurde als neue Phosphorylierungsposition der MAP Kinasen Erk1 und Erk2 identifiziert.

Cdk7/CycH ist als Komponente des generellen Transkriptionsfaktor TFIID, der die C-terminale Domäne der RNAP II phosphoryliert, und als Cdk aktivierende Kinase, die den T-Loop verschiedener Cdks phosphoryliert, bekannt. Im Vergleich zur CTD phosphoryliert Cdk7/CycH c-Myc nicht. Die CTD wird über 6-fach stärker phosphoryliert als c-Myc. Die leichte Erhöhung durch c-Myc könnte auf Hintergrundrauschen bzw. unspezifische Phosphorylierungen zurückzuführen sein. Diese Beobachtung grenzt Cdk7/CycH deutlich von P-TEFb ab, welches eine starke Kinaseaktivität für c-Myc zeigte.

Die Phosphorylierung von c-Myc durch P-TEFb (Cdk9/CycT1) ist überraschenderweise sogar effizienter als die Phosphorylierung der CTD. Somit scheint c-Myc ein besseres Substrat für P-TEFb darzustellen als das bisher hauptsächlich bekannte Substrat. Die Positionen S62 und S71 in c-Myc werden dabei deutlich gegenüber den anderen vier möglichen Phosphorylierungsstellen präferiert. Die beiden Transkriptions-elongationskinasen Cdk12/CycK und Cdk13/CycK zeigen auf einer nicht vorphosphorylierten CTD sehr geringe bis keine Aktivität. Sie brauchen für ihre Aktivität eine Vorphosphorylierung an Position Ser7. Diese Spezifität zeigt sich auf c-Myc nicht. c-Myc ist nicht vorphosphoryliert und wird sehr spezifisch von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK phosphoryliert. Dabei wird die Position S62 stark bevorzugt und die Position S71 ebenfalls phosphoryliert. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dirk Eick vom Helmholtz-Zentrum in München, Antikörper gegen die c-Myc Epitope entworfen und untersucht werden. Allerdings konnten während dieser Arbeit keine spezifischen Antikörper hergestellt werden.

In einem direkten Vergleich zwischen der CTD, c-Myc wt und der S62 Mutante sollte die Anfangsphase der Kinasereaktion von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK untersucht werden. Dazu wurde die Phosphatübertragung durch die Kinasen über die Zeit verfolgt (Abbildung 4.51).

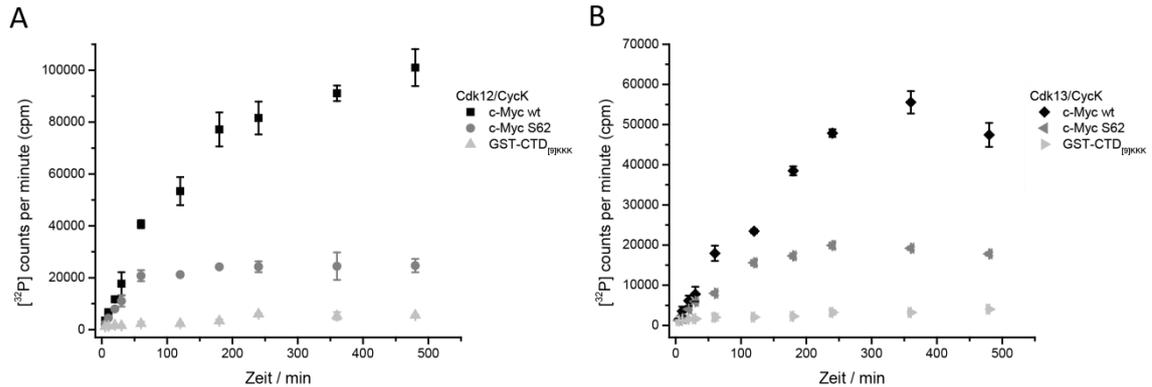


Abbildung 4.51: Zeitabhängige Kinasereaktion von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK auf c-Myc im Vergleich zur CTD

Die Kinasereaktion von 0,2 μ M **A:** Cdk12/CycK und **B:** Cdk13/CycK wurden auf c-Myc wt, c-Myc S62 und der GST-CTD_{[9]K} über die Zeit verfolgt.

In diesem Kinaseassay kann nur eine minimale Aktivität der Kinasen auf die CTD verzeichnet werden. Die Phosphorylierung auf das c-Myc Substrat, das nur Ser62 als Phosphorylierungsposition aufweist, wird schon nach 60 min eine vollständige Phosphorylierung erreicht. Eine Steigerung nach 1 h Inkubationszeit ist nicht zu erkennen, was für eine sehr schnelle Reaktion der Kinase spricht. Auch Wildtyp c-Myc wird schnell phosphoryliert.

In Zukunft könnte es möglich sein, compounds zu entwerfen, die in der Transkriptionselongation auf c-Myc/P-TEFb oder Cdk12/CycK bzw. Cdk13/CycK wirken und so die Zellproliferation von Krebszellen stoppen könnten. Dabei stellt der Inhibitor Dinaciclib einen potentiellen Kandidaten dar.

Die in dieser Studie verwendeten Kinasen und deren Regulationsfaktoren nehmen eine zentrale Rolle in zahlreichen pathogenen Prozessen ein. Dabei können die Proteine nicht nur in Zusammenhang mit verschiedenen Krebsarten wie Leukämie, HIV-1 Infektion, Brust-, Eierstock-, Hoden- und Dickdarmkrebs, sondern auch mit kardialer Hypertrophie gebracht werden. Die Deregulation sowohl der CTD Kinasen als auch der c-Myc-Kinasen in verschiedenen Krankheitsbildern macht diese zu attraktiven Zielmolekülen. Dabei muss bei dem Design neuer Inhibitoren sowohl die Spezifität als auch die Exklusivität gewährleistet sein.

5 Diskussion und Ausblick

In Eukaryoten werden proteinkodierende Gene von der RNA Polymerase II transkribiert. Neben dem konservierten, aktiven Zentrum besitzt die RNAP II eine einzigartige repetitive Struktur am Carboxy-Terminus. Biochemische und genetische Studien zeigten, dass diese Domänen essenziell für mehrere Schritte der Regulation der Genexpression sind (Palancade and Bensaude, 2003; Phatnani and Greenleaf, 2006; Sims et al., 2004). Diese C-terminale Domäne (CTD) von Rpb1 ist aus Heptapeptid-Wiederholungen zusammengesetzt, deren Anzahl in verschiedenen Organismen variiert, wobei aber die allgemeine Struktur der Siebener-Wiederholung beibehalten wird. Im Verlauf des Transkriptionszyklus wird ein hochvariables Phosphorylierungsmuster der RNAP II CTD durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Kinasen und Phosphatasen gebildet (Bataille et al., 2012; Kim et al., 2010; Mayer et al., 2010; Tietjen et al., 2010). Dabei können alle Aminosäurereste der CTD modifiziert werden, wodurch ein 'CTD-Code' generiert wird, der die Rekrutierung verschiedener Prozessierungsfaktoren reguliert (Buratowski, 2003).

5.1 Substratspezifität und Regulation verschiedener Kinasen

Erk1 und Erk2 sind RNAP II CTD Kinasen

Mit der Entdeckung des humanen Enzyms Erk als CTD Kinase wurde eine weitere Komponente, die zur Regulation der Transkription führen könnte, bekannt. Schon 1995 wurde Erk als mögliche CTD Kinase beschrieben (Venetianer et al., 1995). Allerdings sind vermutlich aufgrund der zeitgleich publizierten Kinase P-TEFb bisher nicht viele Studien zu Erk verfasst. In dem ersten Teil dieser Arbeit wurden daher erstmals *in vitro* Experimente zur Substratspezifität von Erk1 und Erk2 auf der RNAP II CTD durchgeführt. Die biochemischen Untersuchungen setzten die Expression und die Aktivität sowie ein höchst mögliche Reinheit der Kinase voraus. Eine aktive Kinase konnte durch rekombinante Coexpression in *E. coli* mit der Kinase MEK, die zur Phosphorylierung von Erk führt, erreicht werden. Durch GST-Affinitätschromatographie mit anschließender Größenausschlusschromatographie wurde die Reinheit der Kinasen erzielt. Die Aktivität der Kinase konnte sowohl durch ESI-MS Analysen als auch durch radioaktive Kinaseassays bestätigt werden. Anhand von Western Blot-Analysen konnte eine überwiegende Serin 5 Phosphorylierung der CTD gezeigt werden, was sich mit den Ergebnissen aus vorherigen Studien deckt (Bonnet et al., 1999; Trigon et al., 1998). Eine Bildung der IIm-Form der CTD durch Erk, die durch osmotischen und oxidativen Stress oder durch Serum Stimulation hervorgerufen wird und die mit der Erk Aktivität in Verbindung gebracht wird, konnte dagegen nicht bestätigt werden (Bonnet et al., 1999). In Studien zu Erk wurde gezeigt, dass durch eine neue phosphorylierte Untereinheit der CTD entsteht, die IIm Form. Neben der Aktivität auf eine unphosphorylierte consensus Sequenz besitzt Erk überraschender Weise

eine etwa dreimal höhere Spezifität für Ser2-vorphosphorylierte CTD-Peptide. Eine erhöhte und schnellere Phosphorylierung durch Erk nach vorheriger Ser2 Phosphorylierung lässt eine Kombination der beiden Phosphorylierungen in einer Wiederholung zu und lässt eine Präferenz von Erk für eine CTD erkennen, die schon an Ser2 durch eine andere Kinase vorphosphoryliert wurde. Bei diesem konsekutiven Mechanismus erkennt die Kinase definiert vorhandene Phosphorylierungen und bindet diese mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit bevorzugt gegenüber unphosphorylierten Bereichen. Eine Richtungsabhängigkeit der Phosphorylierungsreaktion hin zum N-terminalen Ende konnte ebenfalls durch einen radioaktiven Kinaseassay gezeigt werden.

Zukünftige Studien könnten die zelluläre Relevanz von Erk zeigen und die Kinase genauer in den Transkriptionszyklus einordnen. Zudem können *in vivo* Experimente zu weiteren Aufschlüssen über eventuelle Regulationsfaktoren der Erk-Kinasen führen.

Brd4 aktiviert die P-TEFb vermittelte Phosphorylierung der CTD

Um den Einfluss verschiedener Cofaktoren auf die P-TEFb Aktivität zu untersuchen, wurden Studien sowohl zur Substratspezifität als auch zur Hexim1 vermittelten Inhibition mit Brd4, AFF4 und Tat durchgeführt. Dabei konnte die PID von Brd4 nicht nur die Hexim1 vermittelte Inhibition aufheben, sondern auch die katalytische Aktivität von P-TEFb für die RNAP II CTD Phosphorylierung steigern. Die Analyse in einem Kinaseassay mit radioaktiv-markiertem Co-Substrat ATP ergab einen höheren stimulatorischen Effekt von Brd4 PID auf einer an Position Ser7 vorphosphorylierten CTD. Dabei phosphorylierte P-TEFb in Anwesenheit von Brd4 PID bevorzugt Ser5 auf einer Ser7 C-terminal vorphosphorylierten CTD und führte somit zu keiner Änderung der Substratspezifität. Diese Beobachtung stimmt mit der Funktion von Brd4 aktiviertem P-TEFb überein, bei der P-TEFb die RNAP II aus dem promotor-proximalen Pausieren in die produktive Elongation überführt. Die gesteigerte Aktivierung könnte die Phosphorylierungsreaktion in Zellen erhöhen, bei der Brd4 über die N-terminale Domäne an die Histone bindet und über die C-terminale Region P-TEFb zur Transkriptionsstelle rekrutiert. Die Ser2 Phosphorylierung, die ebenfalls für P-TEFb beschrieben wurde, ist mit dem Spleißvorgang und der RNA-Prozessierung assoziiert (Gu et al., 2013) und geht nicht mit der Funktion von P-TEFb als Elongationsfaktor einher.

In massenspektrometrischen Analysen von P-TEFb phosphorylierten CTD-Peptiden übersteigt die maximale Anzahl an Phosphorylierungen nicht die Anzahl der vorhandenen CTD-Heptadwiederholungen. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Brd4 vermittelte Transkriptionsstimulation nicht durch die Phosphorylierung von anderen und unspezifischen Serinen erreicht wird, sondern durch einen schnelleren, effizienteren Mechanismus erfolgt.

Eine Interaktion zwischen CycT1 und Brd4 PID konnte nicht detektiert werden, stattdessen konnte eine Bindung mit einer Dissoziationskonstante von 0,47 μM von Brd4 PID mit dem Cdk9/CycT1 Komplex gezeigt werden, was eine wahrscheinliche Wechselwirkung von

Brd4 PID mit der Cdk9 Untereinheit anzeigt. Dabei unterscheidet sich der Mechanismus der P-TEFb Aktivierung durch Brd4 von dem der HIV-1 Tat Aktivierung. Die Tat Aktivierung zeigte eine Verdrängung von Hexim1 und der 7SK snRNA von der CycT1 Untereinheit in P-TEFb (Barboric et al., 2007; Krueger et al., 2010; Schulte et al., 2005). Eine Verdrängung von Hexim1 durch Brd4 liegt nicht vor (Itzen et al., 2014). Daher ist der Mechanismus der Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 anders als der Mechanismus von HIV-1 Tat, bei dem eine Verdrängung von Hexim1 durch HIV-1 Tat beobachtet werden konnte.

Für die Brd4-vermittelte Aktivierung von P-TEFb Aktivierung wurde ein zweistufiger Mechanismus vorgeschlagen, bei dem sowohl die Bromodomänen, als auch die PID an der Bindung an P-TEFb involviert sind (Schröder et al., 2012). Dabei vermittelt die Wechselbeziehungen die Acetylierung von vier Lysinresten in der zentralen Region von CycT1 (Cho et al., 2009) und die zweite Bromodomäne von Brd4 bindet an das tri-acetyliertes CycT1, welches an Position K380, K386 und K390 acetyliert ist, mit einer ähnlichen Affinität, wie sie für acetylierten Histone beschrieben wurde (Cho et al., 2009; Vollmuth and Geyer, 2010). Da unsere Ergebnisse auf eine Bindung von Brd4 PID und Cdk9 hinweisen, könnte eine synergistische Interaktion von Brd4 PID und der Bromodomänen mit beiden P-TEFb Untereinheiten vorliegen und so eine stabile Bindung von zwei Interaktionsdomänen eingehen, die fast 900 Aminosäuren entfernt auseinanderliegen. Eine für die Bindung von Brd4 und CycT1 benötigte Acetylierung wird durch die rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* nicht erreicht. Dieses Fehlen der posttranslationalen Modifikationen der CycT1 Untereinheit könnte daher zur Auslassung der Bindung geführt haben. Die Acetylierung der CycT1 Untereinheit könnte die Freisetzung von Brd4 vom Chromatin und Histon erleichtern, indem sie eine alternative Bindungsstelle für die beiden Bromodomänen aufweist. Dieser Übergang könnte den P-TEFb-Brd4 Komplex von den Histonen loslösen und den Elongationsprozess durch die Bindung von P-TEFb an die RNAP II stabilisieren. Auch wurde die Lysin-Acetylierung im distalen Bereich der CTD beschrieben (Schröder et al., 2013), die in ähnlicher Weise als Bindungsstelle für Brd4 fungieren könnte. In einer früheren Studie wurde die Freisetzung von P-TEFb aus dem 7SK snRNP durch die C-terminal lokalisierten 154 Aminosäuren von Brd4 beschrieben, dessen Funktion über das C-terminale helikale Element an Position 1329-1345 vermittelt wird (Krueger et al., 2010). Zudem konnte eine Funktion des Leucin Motives und der polybasischen Region der PID identifiziert werden.

Für Brd4 wurde kürzlich eine Phosphorylierung der zweiten Bromodomäne durch die Casein-Kinase II gezeigt, die einhergeht mit einem Mechanismus der Phosphatübertragung an unmodifizierten Bromodomänen und Aktivatorrekrutierungsstellen (Wu et al., 2013). Diese kombinierte Interaktion der N- und C-terminalen Region könnte auch für die P-TEFb Bindung und Aktivierung moduliert werden. Eine Sequenzähnlichkeit zwischen Brd4 PID und HIV Tat wurde gefunden, dabei besitzen beide Proteine ein RxL-Motiv, ein Arginin-reichen Motiv und ein Dileucin-Motiv. Für die Tat vermittelte Aktivierung von P-TEFb ist die RNA TAR von essentieller Bedeutung, daher könnte auch bei der PID vermittelten Aktivierung eine RNA oder DNA eine Rolle spielen. Dabei könnte das arginin-reiche Motiv

mit den Phosphatgruppen von doppelsträngigen Oligonukleotiden binden, ähnlich wie in Tat, bei dem Tat an die große Furche der RNA TAR bindet (Anand et al., 2008). Das polybasische Cluster könnte zudem mit den sauren Phosphorylierungsgruppen der CTD wechselwirken und dadurch die Substraterkennung stimulieren.

Ähnlich wie Brd4 wurde auch für Hexim1 ein Zwei-Bindungsmodell an beide Untereinheiten von P-TEFb gezeigt (Czudnochowski et al., 2012; Schröder et al., 2012). Während die C-terminal dimerisierende TBD von Hexim1 für die Erkennung von CycT1 erforderlich ist, inhibiert ein hoch konserviertes N-terminales PYNT-Motiv die Kinaseaktivität von Cdk9 (Czudnochowski et al., 2012; Michels et al., 2004). Die PID könnte daher nur mit dem aktiven Zentrum der Kinase interagieren, um eine Aktivierung von P-TEFb in Gegenwart von Hexim1 zu erreichen. Mit den biochemischen Eigenschaften, die für die Interaktionsbereiche gezeigt wurden, könnten zukünftige Studien die strukturellen Details der Brd4 PID vermittelten P-TEFb Aktivierung aufklären. Diese Daten legen ein Modell nahe, bei dem Brd4 auf die Kinaseuntereinheit Cdk9 von P-TEFb wirkt, um die Inhibition durch Hexim1 aufzuheben und die Substraterkennung zu stimulieren.

Der genaue Mechanismus der Brd4 vermittelten Stimulation von P-TEFb konnte bis heute noch nicht geklärt werden. Die katalytische Aktivität könnte zum Beispiel durch eine höhere Affinität für das negativ geladene CTD Substrat durch elektrostatische Wechselwirkungen erhöht werden.

AFF4 aktiviert die P-TEFb vermittelte Phosphorylierung der CTD

Die effiziente HIV Transkription erfordert die Tat/TAR vermittelte Rekrutierung des Superelongationskomplexes (SEC) an die HIV Promotoren. In Abwesenheit der für die RNAP II Aktivität benötigten Elongationsfaktoren verbleibt der Komplex im Promotorproximalen Pausieren.

Der N-Terminus von AFF4 konnte als hinreichend für die Interaktion mit P-TEFb identifiziert werden (He et al., 2010; Lin et al., 2010). Durch eine Interaktion von AFF4 mit CycT1 verändert AFF4 seine Struktur und liegt α -helikaler vor. So nimmt die Bindung von CycT1 Einfluss auf die Sekundärstruktur von AFF4, was zu einer veränderten Eigenschaft von AFF4 führen könnte und das Protein stabilisieren könnte. Zudem konnte in Bindungsstudien keine Dimerisierung der Protein-Komplexe festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein 1:1-Komplex zwischen CycT1 und AFF4 gebildet wurde. Die Bindungsaffinität von ca. 60 nM weist auf eine mittelstarke Bindung hin. Die Bindung zwischen Hexim1 und CycT1 wurde im niedrigen mikromolaren Bereich bestimmt (K_d : 2,3 μ M) (Schonichen et al., 2010). Da die Bindung zwischen CycT1 und AFF4 schwächer ist, würde bei gleicher Bindestelle eine Verdrängung von Hexim nur durch hohe Konzentrationen von AFF4 erreicht werden können.

In Pulldown Experimenten konnte diese Verdrängung von Hexim1-gebundenem CycT1 durch AFF4 beobachtet werden. Es konnte keine Bildung eines ternären Komplexes festgestellt werden, was für die gleiche Bindungsstelle von Hexim1 und AFF4 an CycT1

sprechen würde. An der Bindung zwischen AFF4 und CycT1 sind hauptsächlich C-terminale Aminosäurereste des CycT1 Konstrukts 7-262 beteiligt und zwischen Tat und CycT1 5-267 konnten Interaktionen in CycT1 nachgewiesen werden, die über die Struktur in CycT1 verteilt vorliegen (Anand et al., 2008; Schulze-Gahmen et al., 2013). Mit Hilfe des Programms PDBePISA (EMBL-EBI, *Protein Data Bank in Europe*) konnte festgestellt werden, dass Tat und AFF4 nicht mit den gleichen Bindungsstellen in CycT1 interagieren, was durch die gelöste Kristallstruktur von P-TEFb-AFF4-Tat bestätigt wurde (Schulze-Gahmen et al., 2014). Der Komplex zwischen CycT1 und Hexim1 wurde kristallographisch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gelöst. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Hexim1 sowohl an die Cdk9 Untereinheit, als auch an die Cyclinboxen der CycT1 Untereinheit binden muss, da eine geringere Interaktion zwischen CycT1 und Hexim1 im Vergleich zu einer stärkeren Affinität von P-TEFb zu Hexim1 beobachtet werden konnte (Czudnochowski, 2009; Schonichen et al., 2010; Schulte et al., 2005). Dennoch kann aufgrund der Tatsache, dass HIV-1 Tat Hexim1 von CycT1 verdrängen kann und AFF4 ebenfalls, darauf geschlossen werden, dass Hexim1 sowohl an die Aminosäurereste bindet, die für die Interaktion zwischen Tat und CycT1 benötigt werden, als auch an die, die für die Interaktion zwischen AFF4 und CycT1 eine Rolle spielen. Durch die Bindung von Tat an CycT1 entstehen neue Oberflächenstrukturen (Anand et al., 2008; Schulze-Gahmen et al., 2014; Tahirov et al., 2010). Jedoch findet dadurch keine Änderung der Substratspezifität der Kinase Cdk9/CycT1 statt (Bösken, 2013). Auch in Anwesenheit des Cofaktors AFF4 konnte keine Beeinflussung des Erkennungsprofils von CTD Substraten durch Cdk9/CycT1 beobachtet werden (Bösken, 2013).

Die Röntgenstruktur des Tat-AFF4-P-TEFb Komplexes zeigte Wechselwirkungen, die die Präferenz von Tat für SEC vermittelt. Die Kristallstruktur der N-terminalen Aktivierungsdomäne von AFF4, die P-TEFb zu dem SEC rekrutiert, zeigte nur eine Bindung für die CycT1 Untereinheit und nicht für die Cdk9 Untereinheit (Schulze-Gahmen et al., 2013), was in dieser Studie anhand kalorimetrischer Messungen ebenfalls beobachtet wurde. Diese Interaktion unterstützt die Bindung von HIV-1 Tat an CycT1, während Tat die TBD (CycT1 bindende Domäne) von Hexim1 durch einen exklusiven Bindungsmechanismus verdrängt (Barboric et al., 2007; Schulte et al., 2005). Diese Interaktion könnte entgegen unserer Ergebnisse auf eine alleinige Verdrängung von Hexim1 durch Tat hindeuten, da Tat und AFF4 benachbart zueinander an die CycT1 Untereinheit binden. Mutationen in dem Homolog AFF1, die der Tat-AFF4 Schnittstelle entsprechen, führten sowohl zu einer Reduktion der Affinität zu Tat als auch zu einer verringerten Transkriptionsstimulationsfunktion (Schulze-Gahmen et al., 2013).

Die Tat Bindung an den AFF4-P-TEFb Komplex induziert eine Verschiebung des AFF4 Rückgrats, um ungünstig enge Kontakte zu Tat zu vermeiden (Schulze-Gahmen et al., 2014). Diese Verschiebungen in AFF4 verändern die Ausrichtung der Tat-Bindungstasche in AFF4-P-TEFb, die einen möglichen Angriffspunkt für HIV Transkriptionsinhibitoren aufweisen könnte (Schulze-Gahmen et al., 2013). Die Tat-AFF4-P-TEFb Struktur zeigte auch, dass AFF4 und Tat Einfluss auf die Faltung des CycT1 TRM (engl.: *Tat/TAR*

recognition motif) haben, wodurch eine Stabilisierung der TRM Konformation in der Hybridschnittstelle begünstigt wird. Die TRM Konformation ist in dem P-TEFb-Tat Komplex ungeordnet, in P-TEFb alleine wird die TRM Konformation durch Kristallkontakte stabilisiert, die zu einem Verschluss der AFF4 Bindungsstelle und zu einer Verhinderung der Kontakte zwischen C261 in CycT1 und den Zn^{2+} Ionen von Tat führt (Baumli et al., 2008; Garber et al., 1998). Zusammen ergibt sich eine essentielle Rolle sowohl von der AFF4-Tat Bindung als auch von der AFF4-TRM Interaktion. Durch den Nachweis dieser Strukturen, die die Interaktionsflächen und beteiligten Aminosäurereste der verschiedenen Proteine offenlegen, können Inhibitoren gezielt gegen diese Positionen entworfen werden.

Die Struktur des humanen Cdk13/CycK Komplexes

Neben P-TEFb und Cdk12 stellt Cdk13 eine weitere Kinase dar, die im Transkriptionsvorgang involviert ist. Die für die Aktivität notwendige Bindung der CycK Untereinheit und die Phosphorylierung der Threonins 871 im Aktivierungssegment konnten massenspektrometrisch bestätigt werden. Durch Western Blot-Analysen konnte die präferierte Phosphorylierung an Position Ser5 bestimmt werden. Allerdings könnten möglich vorhandene Cofaktoren *in vivo* zu einer Änderung der katalytischen Aktivität und der Substratspezifität der Kinase führen.

Das gelöste Strukturmodell des humanen Cdk13/CycK Komplexes zeigt die typischen strukturellen Eigenschaften einer Kinase (Hönig, 2013). Das CycK ist relativ zur Cdk13 Untereinheit um 21° im Vergleich zu der Zellzykluskinase Cdk2/CycA verschoben. Diese Rotation wurde sowohl für den Cdk9/CycK Komplex als auch für den Cdk12/CycK Komplex beschrieben (Bösken et al., 2014). Dieses besondere Merkmal von Transkriptionselongationskinasen könnte für die spezifische Substratbindung essentiell sein oder einen regulativen Effekt ausüben.

Im aktiven Zentrum von Cdk13 konnten zwei Magnesiumionen identifiziert werden. Das MgII ist oktahedral koordiniert und bleibt während des Phosphattransfers über einen wasservermittelnden Kontakt gebunden. Das MgI hingegen ist schwächer koordiniert und wurde mit der ADP-Freisetzung in Verbindung gebracht (Bao et al., 2011).

Das phosphorylierte Threonin im Aktivierungssegment von Cdk13 interagiert mit den beiden Argininen an Position 836 und an Position 860 des C-terminalen Flügels der Kinase. Im Cdk2/CycK-Komplex ist ein drittes Arginin an der Interaktion mit dem Threonin involviert. In Cdk13 entspricht dieses Arginin der Position 751 und interagiert mit dem Glutamat an Position 108 in CycK. Dieses Arginin ist in Cdk9, Cdk12 und Cdk13 konserviert und könnte eine Funktion bei der Erkennung der Cyclin-Untereinheit übernehmen.

Die Cdk13/CycK Struktur enthält eine C-terminale Verlängerung außerhalb der kanonischen Flügel der Kinase, die einzigartig für Transkriptionselongationskinasen sind und dessen Verlust mit einer Abnahme der Aktivität korreliert. Dieser C-terminale Fortsatz

besteht aus dem DCHEL-Motiv und einem darauf folgenden polybasischen Cluster. Charakteristische Konformationsänderungen zwischen N- und C-terminalem Flügel von Kinasen sind in der Regulierung und dem Reaktionsmechanismus involviert. In anderen Studien konnte der C-terminalen Verlängerung mehreren Kinasen auch eine funktionelle Eigenschaft und regulatorische Rolle zugesprochen werden (Endicott et al., 2012; Huse and Kuriyan, 2002). Die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase I beispielsweise beinhaltet ein C-terminales *Helix-Loop-Helix* Segment, das mit beiden Flügeln der Kinase wechselwirkt und das katalytische Zentrum in einer autoinhibierten Form hält (Goldberg et al., 1996). Das HE-Motiv im C-terminalen Fortsatz von Cdk13 könnte eine ähnliche Funktion wie das der Proteinkinase A erfüllen, dessen C-terminale Verlängerung sich durch die ATP Bindung umlagert und so die Stabilisierung der Kinase während der katalytischen Aktivität gewährleistet (Adams, 2001; Madhusudan et al., 2002). Der Reaktion der Substratbindung und die Freisetzung des Produkts zeigen einen komplizierteren Mechanismus, der von der Vielzahl der Phosphorylierungen in einer einzigen Kette der CTD bestimmt wird. Das DCHEL-Motiv interagiert mit dem Nukleotid im aktiven Zentrum und stabilisiert es während der Reaktion. Die Kristallstruktur, die den C-terminalen Fortsatz von P-TEFb enthält, wurde kürzlich beschrieben und deutet einen geordneten Mechanismus an, bei dem das phosphorylierte Substrat als erstes die enzymatische Aktivierungstasche verlässt (Baumli et al., 2012). Die Beteiligung des polybasischen Clusters an der enzymatischen Aktivität von Cdk13 unterstützt die Hypothese eines Mechanismus, der die Assoziierung des negativ geladenen CTD Substrats einschließt. Dieses polybasische Cluster könnte mit der im Verlauf der Transkription stark phosphorylierten CTD interagieren und sie für den Phosphattransfer fixieren. Eine solche Funktion konnte jedoch bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden.

Das Ortholog zu Cdk12 und Cdk13 in Hefe ist Ctk1 und benötigt einen weiteren Faktor Ctk3 für seine vollständige Aktivierung (Hautbergue and Goguel, 2001). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass noch weitere Faktoren zur vollständigen Aktivierung von Cdk13 benötigen werden. Die Identifizierung von Cdk13/CycK regulierenden Faktoren könnte in Zukunft zum weiteren Verständnis der Regulation der Transkriptionselongation beitragen und die Komplexität des Transkriptionszyklus weiter aufschlüsseln.

Zudem wurde bereits in vergangenen Studien gezeigt, dass die CTD an DNA binden kann (Suzuki, 1990) und dort möglicherweise negative regulatorische Elemente verdrängt, wodurch wiederum Interaktionen zwischen Aktivatoren und Transkriptionsfaktoren in den Promoter-Bereichen zugelassen werden könnten. In *in vitro*-Experimenten konnte die Bindung zwischen der CTD und doppelsträngiger DNA gezeigt werden, bei der die Interaktion unabhängig von der DNA-Sequenz zu sein scheint (Peterson et al., 1991; Suzuki, 1990). Diese Bindung konnte durch die Cdk7 vermittelte CTD Phosphorylierung komplett aufgehoben werden, während die Phosphorylierung durch Cdk9 die Bindung stark verringert (Lolli, 2009). Diese Gegebenheit könnte auch für die Kinasen Cdk12 und Cdk13 eintreten, deren Auswirkung in zukünftigen Experimenten überprüft werden müsste.

In dieser Studie wurden die Kinasen Cdk12 und Cdk13 durch Western Blot-Analysen eine bevorzugte Serin 5 Aktivität zugewiesen. In früheren Studien erwies sich Cdk12 *in vivo* als Serin 2 Kinase (Bartkowiak et al., 2010; Blazek et al., 2011). Die Abweichung der Ergebnisse könnte auf den verschiedenen Ansätzen von *in vitro* und *in vivo* Studien basieren. Allerdings konnte somit zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Kinase eindeutig als Serin 2 Kinase beschrieben werden.

Spleißkinasen als CTD Kinasen?

Da es keine übereinstimmenden Resultate über die Identifikation der Serin 2 Kinase gibt, die für die Einleitung der Transkriptionstermination verantwortlich ist, wurden Dsk1 und SRPK2, die im Spleißvorgang beteiligt sind, auf ihre CTD-Aktivität und Substratspezifität hin untersucht. Da während der Transkription die Serin 2 Phosphorylierung sowohl beim Spleißvorgang als auch bei der 3'-mRNA Prozessierung eine entscheidende Rolle einnimmt, ist es von großer Bedeutung die Serin 2 Phosphorylierung einer bestimmten Kinase zuordnen zu können (Gu et al., 2013).

Dsk1 und SRPK2 sind Spleißkinasen, die spezifisch SR-Proteine, wie das SRSFII Protein phosphorylieren (Aubol et al., 2013). Aufgrund ihrer Bedeutung während des pre-mRNA Spleißens, sollten die Kinasen auch auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, die RNAP II CTD zu phosphorylieren. Der C-Terminus des SRSFII Proteins beinhaltet eine RS2-Domäne, die ein spezifisches Serin-Prolin-reiches Motiv aufweist. Die RS2-Domäne enthält die Aminosäuresequenz [YSPR], ähnlich dem consensus Heptapeptid der CTD. Daher wurde vermutet, dass die Spleißkinasen auch das YSPTSPS-Motiv der CTD erkennen und dieses an Serin 2 phosphorylieren können.

Anhand von radioaktiven Kinaseassays sollte die Substratspezifität der Spleißkinasen geklärt werden. Die Spezifität konnte aber aufgrund zu niedriger Aktivität nicht detektiert werden. Das Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass in unseren Assays die Peptide mit drei Wiederholungen eine zu kurze Erkennungssequenz für die Kinasen aufweisen, weil für die Aktivität der Kinasen eine CTD benötigt wird, die mehrere Wiederholungen beinhaltet. *In vivo* Experimente haben gezeigt, dass ab einer Länge von 16 Wiederholungen die Phosphoserine an Position 2 und 5 phosphoryliert werden können, während das Threonin an Position 4 und das Serin an Position 7 einer längeren CTD zwischen 24 und 35 Wiederholungen bedürfen (Chapman et al., 2008; Heidemann and Eick, 2012; Heidemann et al., 2013). Eine bestimmte Länge der CTD könnte also notwendig sein, um eine optimale Andockstelle für CTD Kinasen sowie die assoziierenden Faktoren zu erhalten. Zudem werden in Säugetierzellen ca. 20 Wiederholungen für den korrekten Spleißvorgang sowie für die 3'-mRNA Prozessierung gebraucht (de la Mata and Kornblihtt, 2006; Rosonina and Blencowe, 2004), was einen weiteren Grund für die fehlende Aktivität der Kinase auf den kurzen Substratpeptiden darstellen könnte.

Weiterhin sollte in Western Blot-Analysen die Bestimmung der Phosphorylierungsstelle auf der volllängen RNAP II CTD durch die Kinasen erreicht werden. Eine solche Aktivität

konnte aber auch hier nicht detektiert werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Spleißkinasen die CTD entweder nicht phosphorylieren oder eine Vorphosphorylierung an einer bestimmten Position für ihre Aktivität benötigen. Allerdings kann auf einer volllängen CTD keine unserer Kinasen nur eine bestimmte Phosphorylierung setzen, die als Vorphosphorylierung dienen könnte, da diese Kinasen leichte Aktivität auch für die jeweils anderen Phosphorylierungspositionen zeigen.

Die Serin 2 Phosphorylierung ist im Transkriptionszyklus mit der Einleitung der Termination verbunden und tritt auf, wenn die Phosphorylierungen der Serine an Position 5 und 7 abnehmen. Das würde dafür sprechen, dass die CTD im Transkriptionszyklus bei Eintreten der Serin 2 Phosphorylierung schon phosphoryliert ist und die Kinase, die eine Serin 2 Spezifität aufweist, ein Signal an einer anderen oder an beiden anderen Phosphorylierungspositionen benötigt.

Zudem konnte eine Phosphorylierung des SR-Proteins durch P-TEFb identifiziert werden. In *in vivo* Studien könnte die Relevanz dieses neu gefundenen Substrats für die Kinase P-TEFb weiter untersucht werden und die Bedeutung der Phosphorylierung für andere Faktoren. Um genauere Aussagen über die Phosphorylierungsposition auf dem SRSFII Protein vorzunehmen, könnte man Peptide Mass fingerprint Analysen heranziehen und die Spezifität der Kinasen weiter analysieren.

CdkF als spezifische Serin 7 CTD Kinase und die Bedeutung der Phosphorylierung

Die RNAP II CTD liegt in allen Organismen konserviert vor. Die vielen Bindungsfaktoren der CTD weisen darauf hin, dass die Prozesse der CTD in Pflanzen ähnlich wie die Prozesse in anderen Eukaryoten ablaufen. Dies zeigt sich beispielsweise bei der TFIIF assoziierten Kinase Cak, die einen Schlüsselregulator der CTD während der Transkription darstellt und evolutionär konserviert ist (Shimotohno et al., 2004; Umeda et al., 1998). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die aus *Arabidopsis thaliana* stammende Kinase CdkF untersucht, die bislang kein aus der Aminosäuresequenz unmittelbar ersichtliches Pendant in Hefe oder Mensch aufweist.

Die Entdeckung von CdkF als Serin 7 Kinase (Hajheidari et al., 2012) konnte in dieser Studie durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen CTD-Phosphoepitope bestätigt werden. Die alleinige Serin 7 Phosphorylierung zeigte die hohe Spezifität der Kinase für die CTD. Diese Detektion zeigte erstmals eine monospezifische Kinase in *in vitro* Studien, die keine unspezifische Phosphorylierung oder Artefakte aufwies. Die Phosphorylierung an Position 7 konnte jedoch erst nach über einer Stunde detektiert werden, was auf eine geringe Aktivität der Kinase auf die CTD schließen lässt. Hier könnte für eine gesteigerte Aktivität der Kinase eine Vorphosphorylierung der CTD benötigt werden. Zudem konnte in unseren Western Blot-Analysen die durch Antikörper detektierten Banden gegen die Serin 7 Phosphorylierung keine Zwischenstufen aufweisen. Die hyperphosphorylierte Form der CTD wandert in einem SDS-PAGE Gel langsamer als die unphosphorylierte I₂a-Form. Dieses Phänomen ist nicht ausschließlich auf die zusätzliche

Masse der Phosphatgruppen zurückzuführen, da diese dafür zu klein ist. Auch bei mehreren Phosphorylierungen würde man kein verändertes Laufverhalten allein durch die Massenzunahme in einem SDS-PAGE Gel erkennen können. Dieses Phänomen könnte vielmehr ihren Hauptgrund in der Isomerisierung der Proline an Position 3 und 6 der CTD-Heptade haben. Die Isomerisierung wird wahrscheinlich von dem Phosphorylierungszustand der CTD beeinflusst, indem eine bestimmte Stellung der Proline stabilisiert wird und das Erkennungsmotiv für die verantwortlichen Isomerasen liefern. Die Sequenz der CTD weist dabei nur nach dem Serin 2 und Serin 5 ein Prolin auf, während die Serin 7 Position von einem Tyrosin-Rest flankiert wird (Songyang et al., 1996). Diese könnte erklären, dass in unseren Western Blot-Analysen keine Zwischenstufen detektiert werden konnten. Eine Änderung im Laufverhalten der CTD konnte zwar beobachtet werden, allerdings blieben die für die CTD typischen Zwischenstufen, die von der I_a-Form zur I_o-Form führen, aus.

Im Transkriptionszyklus tritt die Serin 7 Phosphorylierung am Initiationsstartpunkt auf, was mit einer unphosphorylierten CTD einhergeht. Die humane CTD weist nur an 27 von 52 Wiederholungen ein Serin auf, da vor allem im distalen Bereich der humanen CTD ein Lysin anstelle eines Serins lokalisiert ist. Dagegen befindet sich in *Arabidopsis thaliana* nur ein Lysin in der gesamten CTD. Diese Beobachtung könnte die geringe Aktivität auf der humanen CTD mit 52 Wiederholungen begründen. Allerdings weist die CTD in *Arabidopsis thaliana* selbst nur in 16 von 41 Wiederholungen ein Serin an Position 7 auf.

Als komplementäre Technik neben den Western Blot-Analysen diene ein Kinaseassay mit radioaktiv-markiertem ATP als Cosubstrat und synthetischen Substratpeptiden, die drei Heptapeptidwiederholungen beinhalten. Hiermit sollte die Aktivität bestätigen und die Spezifität für eventuelle Vorphosphorylierungen detailliert untersucht werden. Durch die geringe Aktivität der Kinase auf den Peptiden konnte in diesem Assay – wie zuvor bei den Spleißkinasen – keine weitere Bestimmung der Phosphorylierungseigenschaft von CdkF vorgenommen werden. In massenspektrometrischen Studien hingegen konnte demonstriert werden, dass CdkF allem Anschein nach keine Vorphosphorylierung als Erkennung der repetitiven Sequenz benötigt. Hier konnte lediglich nur eine Phosphorylierung auf einem unphosphorylierten Peptid mit drei Heptawiederholungen detektiert werden. So könnte CdkF einem directionalen Mechanismus folgen, bei dem die Kinase nur die Serin 7 Position richtungsabhängig phosphoryliert.

Ein Austausch der Serin 7 Position der consensus CTD zu einer nicht phosphorylierbaren Aminosäure, Alanin, verursacht nur eine schwache Stress verbundene Transkriptionsänderungen in Hefen und Säugerzellen (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). Da neben der Serin 5 auch die Serin 7 Phosphorylierung unter verschiedenen Stressbedingungen konstant bleibt, während sich die Serin 2 Phosphorylierung deutlich verändert (Munoz et al., 2009), könnte hier eine weitere Funktion dieser Modifikation liegen. So wäre es durchaus möglich, dass über bestimmte Kombinationen innerhalb des CTD Modifikationsmusters eine spezifische Genexpression zur Stressantwort gesteuert wird.

Zudem führt der Austausch des Serins an Position 7 zu keiner Auswirkung auf die anderen Phosphorylierungspositionen. Dieser Ersatz hat kaum Einfluss auf die Expression von endogenen oder transient-transfizierten proteinkodierenden Genen (Chapman et al., 2007). Dieses Resultat könnte darauf zurückzuführen sein, dass unter den Phosphoserinresten der CTD das Serin an Position 7 die divergenteste Position ist, die zumeist am Ende der CTD von der consensus Sequenz abweicht. Obwohl das Serin an Position 7 des Heptads der CTD besonders im distalen Bereich durch eine andere Aminosäure ausgetauscht ist, ist diese Aminosäure im proximalen Teil der CTD stark konserviert, was ebenfalls für eine wichtige Rolle dieser Phosphorylierungsstelle spricht. In Zellstudien führte die Reduktion der Serin 7 Phosphorylierung in *Arabidopsis thaliana* zu einer fehlenden 3'-Polyadenylierung von kleinen RNAs und Transkriptions-kodierenden Faktoren (Hajheidari et al., 2012) und im Menschen sowohl zu einem deutlichen Defekt in der Transkription menschlicher snRNA-Gene als auch zu einem Defekt der Bildung der 3'-Enden dieser Transkripte (Egloff et al., 2007). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass mindestens ein Element des 'CTD-Codes' auf genspezifische Art und Weise gelesen werden kann. So ist die Serin 7 Phosphorylierung der CTD nötig für eine stabile Interaktion des Integratorkomplexes mit der transkribierenden Pol II. Der Integratorkomplex besteht aus mehreren Untereinheiten und spielt eine tragende Rolle bei der 3'-Prozessierung von snRNAs, ist aber an der Prozessierung von Transkripten proteinkodierender Gene nicht beteiligt (Baillat et al., 2005). Umgekehrt verhindert der Austausch von Serin 5 zu Alanin jedoch die Serin 7 Phosphorylierung (Boeing et al., 2010; Chapman et al., 2007).

Diese Korrelationen der CTD Modifikationsmuster legen eine weiterführende Funktion der Serin 7 Phosphorylierung nahe und zeigt eine bemerkenswerte Erhöhung des ChIP Signals auf Intronbereiche und nicht-kodierende RNA-Gene (Kim et al., 2010; Tietjen et al., 2010).

In Studien zur Bedeutung der Länge der CTD konnte eine Ser7 Phosphorylierung ab einer Länge von 20 Heptawiederholungen der CTD gefunden werden (Chapman et al., 2007). Die RNAPII CTD in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* beinhaltet 15 consensus und 26 Varianten der Heptapeptid-Wiederholungen (Nawrath et al., 1990). Somit stellt die Serin 7 Phosphorylierung in *Arabidopsis thaliana* keine Abweichung dieses Befundes dar. Da weitere Daten bisher fehlen, kann nur vermutet werden, dass die Phosphorylierung durch CdkF über dezentrale Erkennungsmotive an die Länge und die Sequenz der CTD gekoppelt ist.

c-Abl phosphoryliert c-Myc und die RNAP II CTD

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Phosphorylierung des Protoonkogens c-Myc durch die c-Abl Kinase bestätigt. c-Abl interagiert mit der C-terminalen Domäne von c-Myc und phosphoryliert bis zu fünf Tyrosinreste am N-terminus von c-Myc, wobei die Position Y74 stark begünstigt wird (Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013). Die phosphorylierte Form von c-Myc an Position Y74 ist im Cytoplasma lokalisiert und korreliert mit der c-Abl abhängigen Aktivierung von Krebs (Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch c-Abl durch die Isomerase Pin1 gesteigert werden

kann und unabhängig von der WW-Domäne in Pin1 zu sein scheint. c-Myc wurde ebenfalls als ein Substrat von Pin1 gefunden (Yeh et al., 2004), dabei wird das Prolin an Position 59 neben einem phosphorylierten Threonin an Position 58 von Pin1 isomerisiert. c-Abl verstärkt indirekt die Phosphorylierung von c-Myc an Ser62 und Thr58 und die Assoziation mit Pin1 und p300 und die Acetylierung durch p300 (Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013). Interessanterweise stabilisiert die Phosphorylierung der Aminosäurereste Ser62 und Ser71 c-Myc, die wiederum für die c-Myc abhängige Apoptose benötigt wird (Noguchi et al., 2001).

Die Hochregulierung von Pin1 kann mit bestimmten Krebsarten in Verbindung gebracht werden und die Herunterregulierung von Pin1 wird in Zusammenhanf mit der Alzheimer-Krankheit gebracht (Liou et al., 2003; Lu et al., 2007). Inhibitoren von Pin1 könnten damit therapeutischen Zwecken gegen Krebs oder Immunerkrankungen dienen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass c-Abl auch die RNAP II CTD phosphoryliert. Diese Phosphorylierung kann ebenfalls durch die Isomerase Pin1 gesteigert werden und scheint unabhängig von seiner WW-Domäne zu sein. Die CTD kann durch die Kinase c-Abl an Tyrosin 1 phosphoryliert werden (Baskaran et al., 1999), obwohl dieser Modifikation bisher noch keinerlei Funktion zugeordnet werden konnte. Die Phosphorylierung des Tyrosins an Tyr1 wurde schon *in vivo* gezeigt (Baskaran et al., 1993). Die ektopische Expression der c-Abl Tyrosinkinase erhöht dabei die Tyrosin-Phosphorylierung der endogenen Pol II und aktiviert die Expression von HIV-Templaten (Baskaran et al., 1997).

Die beiden Peptidyl-Prolyl-Bindungen in einer consensus Wiederholung der CTD befinden sich entweder in *cis*- oder in *trans*-Stellung. Daraus ergeben sich vier mögliche Konfigurationen für jedes Heptapeptid der CTD. Mindestens ein Protein, das an der Erkennung der Polyadenylierungsstellen beteiligt ist, bindet selektiv an Wiederholungen, deren Proline sich alle in der *trans*-Konformation befinden. Die humane Peptidyl-prolyl *cis-trans* Isomerase Pin1 könnte *in vivo* an der Isomerisierung beteiligt sein. Pin1 besitzt eine PPIase-Aktivität und könnte ein Kandidat für die Regulation der CTD Struktur und ihrer Funktion durch Prolin Isomerisierung sein (Xu and Manley, 2004). Für Pin1 wurde eine Interaktion mit der phosphorylierten CTD gezeigt, worauf eine ungewöhnliche Substratspezifität, gegenüber Peptiden bei denen das Prolin auf ein Phosphoserin oder ein Phosphothreonin folgt, detektiert wurde (Wulf et al., 2005). In Säugetieren gibt es keine Hinweise darauf, dass Pin1 eine positive Rolle in der Polyadenylierung spielt. Bisher konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Bindung beliebiger Transkriptions- oder Prozessierungsfaktoren an die CTD durch enzymatische Prolin-Isomerisierung beeinflusst wird. Jedoch beeinträchtigt Pin1 den Phosphorylierungsstatus der CTD indem es die Phosphatase Fcp1 hemmt, was wiederum einen negativen Effekt auf die Transkription nach sich zieht (Xu and Manley, 2007).

In jeder CTD Wiederholung können Tyrosin 1, Serin 2, Threonin 4, Serin 5 und Serin 7 phosphoryliert werden und Prolin 3 und Prolin 6 unterliegen einer *cis*- und *trans*-Isomerisierung. Durch all diese Veränderungen bleibt die spezielle Zusammenstellung von Aminosäuren relativ flexibel und bietet damit eine enorme Bandbreite an potenziellen

Bindestellen für Transkriptions- und Prozessierungsfaktoren, sowie anderer Faktoren (Sudol et al., 2001).

c-Myc ist ein weiteres Substrat der Transkriptionselongationskinasen

Als Genregulatorprotein ist c-Myc an der Rekrutierung von P-TEFb beteiligt. c-Myc ist ein wichtiges Element in der Regulation von verschiedenen Zellprozessen (Rahl et al., 2010). c-Myc wurde als genereller Faktor in der Aufhebung des promotorproximalen Pausierens einer Vielzahl aller aktiv transkribierten Gene in Mäuseembryos beschrieben (Rahl et al., 2010). Durch die Rekrutierung über die N-terminale Transaktivierungsdomäne von c-Myc an die Cyclin Boxen von CycT1 könnte eine Stimulation der Transkriptionselongation vermittelt werden (Eberhardy and Farnham, 2002; Kanazawa et al., 2003; Mittelstadt et al., 2005). In veröffentlichten Studien wurde eine Aktivität der Transaktivierungsdomäne von c-Myc beschrieben, die zur CTD Phosphorylierung der RNAPII führt und unabhängig von dem C-Terminus von c-Myc ist (Cowling and Cole, 2007). Zudem wurde die Phosphorylierung von c-Myc durch P-TEFb gezeigt (Bösken, 2013).

In dieser Studie wurde bewusst nur die N-terminale Transaktivierungsdomäne von Myc verwendet, da der C-Terminus von c-Myc zu unspezifischen Interaktionen mit Proteinen neigt. Zudem weist nur der N-terminale Bereich in c-Myc mehrere SP Motive und andere mögliche Phosphorylierungsstellen auf, die von verschiedenen Kinasen modifiziert werden können. Dabei wurden die Positionen Thr58, Ser62, Ser71, Ser73, Thr78 und Ser161 als Phosphorylierungsstellen identifiziert. Eine deutliche Phosphorylierung konnte durch die MAP Kinasen und die Transkriptionselongationskinase P-TEFb gezeigt werden. Dabei wird die Position S62 stark bevorzugt und die Position S71 ebenfalls phosphoryliert. Die Phosphorylierung des Substrats c-Myc durch P-TEFb ist effizienter als die Phosphorylierung der RNAP II CTD. Somit scheint c-Myc ein besseres Substrat für P-TEFb zu sein als die RNAPII CTD. Zudem konnten erstmals auch die Transkriptionselongationskinasen Cdk12/CycK und Cdk13/CycK als Phosphorylierungskinasen von c-Myc bestimmt werden. Diese Kinasen brauchen für ihre Aktivität auf der CTD eine Vorphosphorylierung an Position Ser7, die für die Erkennung des Substrats benötigt werden könnte. Diese negative Ladung ist auf dem c-Myc Substrat nicht gegeben. c-Myc wurde nicht von anderen Kinasen vorphosphoryliert und wurde trotzdem sehr spezifisch und effizient von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK phosphoryliert. Eine minimale Aktivität zeigte Cdk8/CycC auf c-Myc. Die Positionen S62 und S71 in c-Myc wurden dabei leicht präferiert. In früheren Studien gab es bereits Hinweise auf eine Interaktion des Transkriptionsfaktors c-Myc mit dem Mediator Komplex (Eberhardy and Farnham, 2001). In *in vitro* Studien konnte die Interaktion zwischen Cdk8 und dem N-Terminus von c-Myc (1-52) gezeigt werden, jedoch keine Phosphorylierung durch den Mediator Komplex (Eberhardy and Farnham, 2001). Eine Phosphorylierung durch Cdk7/CycH und CdkF blieb allerdings aus. So scheint neben der CTD das Protoonkogen c-Myc ein weiteres Substrat für Transkriptionskinasen zu sein.

Auffällig ist, dass – abgesehen von der Position Ser161 – die Phosphorylierungsstellen der Transkriptionselongationskinasen im Bereich der Myc-BoxI lokalisiert sind. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) mit ihren hoch-konservierten Myc-Boxen ist nahezu für alle biologischen Funktionen von c-Myc essentiell. Die Phosphorylierungen der N-terminalen TAD spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von c-Myc (Adhikary and Eilers, 2005; Hann, 2006). Die posttranslationalen Modifikationen der Myc-BoxI konnten hauptsächlich mit der Stabilität und der damit verbundenen Fluktuation von c-Myc in Verbindung gebracht werden (Adhikary and Eilers, 2005; Hann, 2006; Noguchi et al., 1999; Sanchez-Arevalo Lobo et al., 2013). Obwohl c-Myc als Schlüsselfaktor in der Tumorgenese in zahlreichen Studien untersucht wurde, ist die exakte Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen von c-Myc noch nicht vollständig geklärt.

Die Aminosäurereste an Ser62 und Ser71 wurden von allen Kinasen, die in der Lage waren c-Myc zu phosphorylieren, bevorzugt. Im Vergleich zu der RNAP II CTD, bei der sowohl P-TEFb, Cdk12/CycK, Cdk13/CycK als auch die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 eine Phosphorylierung an Position Ser5 zeigten, konnte eine große Übereinstimmung der S62 und S71 Position gefunden werden (Abbildung 5.1).

Substrate	Sequenzen									
Position	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	
CTD Ser5	Tyr ₁	Ser ₂	Pro ₃	Thr ₄	Ser ₅	Pro ₆	Ser ₇	Tyr ₁	Ser ₂	
c-Myc Thr58	Glu	Leu	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	
c-Myc Ser62	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg	Arg	
c-Myc Ser71	Ser	Gly	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Tyr	Val	
c-Myc Ser73	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Val	
c-Myc Thr78	Tyr	Val	Ala	Val	Thr	Pro	Phe	Ser	Leu	
c-Myc Ser161	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Pro	Asn	Pro	Ala	
Spt5 Thr775	Tyr	Gly	Ser	Gln	Thr	Pro	Met	Tyr	Gly	
Spt5 Thr784	Tyr	Gly	Ser	Arg	Thr	Pro	Met	Tyr	Gly	
SRII Ser26	Arg	Arg	Ser	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	
SRII Ser191	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	Pro	Pro	Pro	Val	
SRII Ser208	Ser	Arg	Ser	Lys	Ser	Pro	Pro	Lys	Ser	
SRII Ser212	Ser	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Glu	Glu	Glu	
SRI Ser199	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Gly	
SRI Ser227	Ser	Arg	Ser	Tyr	Ser	Pro	Arg	Arg	Ser	
SRI Ser234	Arg	Ser	Arg	Gly	Ser	Pro	Arg	Tyr	Ser	
SRI Ser238	Ser	Pro	Arg	Tyr	Ser	Pro	Arg	His	Ser	

- hohe Konservierung
- mittlere Konservierung
- schwache Konservierung

Abbildung 5.1: Gegenüberstellung der Phosphorylierungssequenzen von c-Myc, der CTD, Spt5 und den SR Proteinen

Die zentrale Position 0 entspricht in dieser Sequenzgegenüberstellung der Phosphorylierungsstelle und ist in dunkelgrau hinterlegt. Konservierte Aminosäurereste sind entsprechend der Legende markiert. Die möglicherweise peripheren CTD-Phosphorylierungsstellen an Ser2 und Ser7 sind hellgrau hinterlegt. In Grün sind die Substrate dargestellt, die nur von P-TEFb phosphoryliert werden können und in lila sind die Substrate, die von Cdk12, Cdk13, Cdk9 und Erk phosphoryliert wurden, gezeigt.

Neben der CTD ist die Spt5-Untereinheit des negativen Elongationsfaktors DSIF als weiteres wichtiges Substrat des P-TEFb Komplexes beschrieben worden (Kim and Sharp, 2001; Yamada et al., 2006). Zudem konnte in dieser Studie eine Aktivität von P-TEFb auf dem SRSFII Substrat gefunden werden. Diese Phosphorylierungsmotive sind zum Vergleich in Abbildung 5.1 mit aufgeführt. Für Cdk12, Cdk13 und Erk wurde – wie auch für P-TEFb – eine Phosphorylierung der CTD an Serin 5 gefunden und für c-Myc an den Positionen Ser62 und Ser71.

Interessanterweise zeigen die Phosphorylierungsstellen der Spt5-Untereinheit eine deutliche Übereinstimmung mit einem Ser5-, jedoch nicht mit einem Ser2-Phosphorylierungsmotiv der CTD (Abbildung 5.1), das ebenfalls in der Literatur für P-TEFb beschrieben wurde (Bres et al., 2008; Ni et al., 2004; Peterlin and Price, 2006; Zhou et al., 2000). Im Vergleich der Sequenzen von c-Myc mit den etablierten P-TEFb Substraten Rpb1-CTD (pSer5) und

hSpt5 zeigten auf c-Myc die Sequenzmotive Ser62 und Ser71 gegenüber den anderen Phosphorylierungsstellen die größte Übereinstimmung.

Die beiden Phosphorylierungsmotive Ser62 und Ser71 verfügen, wie auch die CTD, über ein Serin an der Position +2. Wie bereits in der CTD befindet sich ebenfalls an dem Phosphorylierungsmotiv von c-Myc Ser71 neben dem typischen (S/T)P-Motiv auch ein Tyrosin an +3. In dem Phosphorylierungsmotiv von Ser62 befindet sich hingegen ein Arginin an dieser Position und scheint keine Auswirkung bezüglich der Aktivität der Kinasen zu haben. Auffällig an dieser Position ist, dass dieses Erkennungsmotiv einer consensus Sequenz mit (S/T)Px(K/R) entspricht, das für die Zellzykluskinasen Cdk1 und Cdk2 beschrieben wurde und eine Interaktion der basischen Aminosäure an der Position +3 mit dem Phosphothreonin im Aktivierungssegment zeigte (Brown et al., 1999).

Trotz zum Teil nur geringer Konservierung der Phosphorylierungsstellen zeichnet sich hiermit eine Präferenz für gewisse Sequenzmotive ab. Dabei bleibt jedoch unklar, wieso Cdk12 und Cdk13 eine Vorphosphorylierung auf der CTD benötigen und auf c-Myc auch ohne Phosphorylierung aktiv sind, obwohl sich die Sequenzen der beiden Substrate so ähnlich sind (Abbildung 5.1). Es kann nur vermutet werden, dass Cdk12 und Cdk13 außerhalb der Phosphorylierungssequenz eine lokalisierte Erkennungssequenz für ihre Aktivität benötigen und so die Phosphorylierung beispielsweise über dezentrale Erkennungsmotive an Cdk12 und Cdk13 gekoppelt ist.

Für P-TEFb wurde eine Phosphorylierung des SRSFII Substrats gefunden. Die Position der Phosphorylierung kann anhand der Sequenz im Vergleich zu schon publizierten Phosphorylierungspositionen abgeschätzt werden. Dabei entsprechen die Sequenzmotive der Positionen Ser26 und Ser208 einer consensus Sequenz mit (S)Px(K/R), die auch in c-Myc an der Position Ser62 gefunden wurde und von P-TEFb phosphoryliert wurde. So würde das Sequenzmotiv der Positionen Ser26 und Ser208 potentielle Kandidaten für eine Phosphorylierung durch P-TEFb darstellen und müssten ebenfalls für Cdk12, Cdk13 und Erk überprüft werden. Ebenfalls wies SRSFI das gleiche Sequenzmotiv an der Position Ser227 auf. In SRSFI an den Positionen Ser199 und Ser234 konnte sogar das für die Kinasen typischere Sequenzmotiv identifiziert werden mit der consensus Sequenz (S)PxY, welches der CTD und der Position Ser71 in c-Myc entsprechen würde.

Im Zusammenhang mit der Apoptose von Zellen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungen der Aminosäurereste Ser62 und Ser71 eine Stabilisierung von c-Myc bewirken (Noguchi et al., 2001). c-Myc bedient sich daher verschiedener Mechanismen bei der Ausübung seiner transkriptionellen Aktivitäten. Zum einen wirkt der Transkriptionsfaktor sowohl als Aktivator als auch als Repressor. Daher ist die Auswertung hinsichtlich der funktionellen Bedeutung der Ergebnisse schwierig. Möglicherweise könnten auch Parallelen zu dem P-TEFb Substrat und Elongationsfaktor DSIF bestehen. DSIF spielt ähnlich wie c-Myc während der Transkription zwei entgegengesetzte Rollen. DSIF inhibiert zusammen mit NELF die Transkription und führt so zum promotorproximalen Pausieren (Chiba et al., 2010; Renner et al., 2001; Wada et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999). Durch die Rekrutierung von P-TEFb werden die Spt5 Untereinheit

von DSIF phosphoryliert und die RD Untereinheit in NELF phosphoryliert. Die Phosphorylierung von NELF bewirkt die Dissoziation vom arretierten Promotor-proximalen Arrestkomplex und DSIF wird in einen positiven Elongationsfaktor transformiert (Hartzog et al., 1998; Kim and Sharp, 2001; Nechaev and Adelman, 2011; Peterlin and Price, 2006; Sims et al., 2004). So wird der Repressor DSIF durch Phosphorylierung seiner Untereinheit Spt5 zu einem Stimulator der Transkription (Yamada et al., 2006).

Zellstudien konnten zeigen, dass c-Myc im Genom von Krebszellen in Promotorregionen akkumuliert und eine Amplifikation der Transkription bewirkt (Lin et al., 2012; Nie et al., 2012). In biochemischen Studien und *in vivo* Analysen gilt es in Zukunft, die Wechselwirkung zwischen c-Myc und P-TEFb in der Transkriptionselongation neu zu evaluieren. Dabei sollte geklärt werden, ob es sich bei c-Myc eventuell um einen weiteren Regulator der Transkriptionselongation handelt, der durch die P-TEFb Phosphorylierung kontrolliert wird.

5.2 Die Generierung eines 'CTD-Codes'

Wichtige Unterschiede in der Aktivität und der damit verbundenen Substratspezifität der Transkriptionselongationskinasen sind insbesondere die Vorphosphorylierungen. Die Kinasen Cdk12 und Cdk13 benötigen für ihre volle Aktivität eine Serin 7 Phosphorylierung. Zudem sind die beiden Kinasen sogar auf einem Serin 2 vorphosphorylierten Substrat noch aktiver als ohne Vorphosphorylierung (Czudnochowski et al., 2012; Hönig, 2013). P-TEFb hingegen ist auf einer unphosphorylierten CTD sehr aktiv, ebenso wie die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2. Gemeinsamkeiten zwischen P-TEFb und Erk liegen auf der Spezifität für eine Serin 5 Phosphorylierung und Unterschiede bei der Vorphosphorylierung. P-TEFb weist eine erhöhte Aktivität auf einem Serin 7 vorphosphorylierten Substrat auf, wohingegen Erk1 und Erk2 auf einem vorphosphorylierten Substrat an Position Serin 2 eine höhere Aktivität als auf einer unphosphorylierten CTD aufweisen und ein Ser7 Peptid nicht als Substrat erkennen. Eine Serin 7 Phosphorylierung wurde in Pflanzen der Kinase CdkF zugeschrieben und müsste im Menschen noch genau einer Kinase zugeschrieben werden (diese Studie und Shimotohno et al., 2004). So könnten P-TEFb, Erk1, Erk2, CdkF und Cdk7 in der Transkriptionsinitiation eine Rolle spielen und P-TEFb, Erk1, Erk2, Cdk12 und Cdk13 während der Elongation eine Funktion haben (Abbildung 5.2).

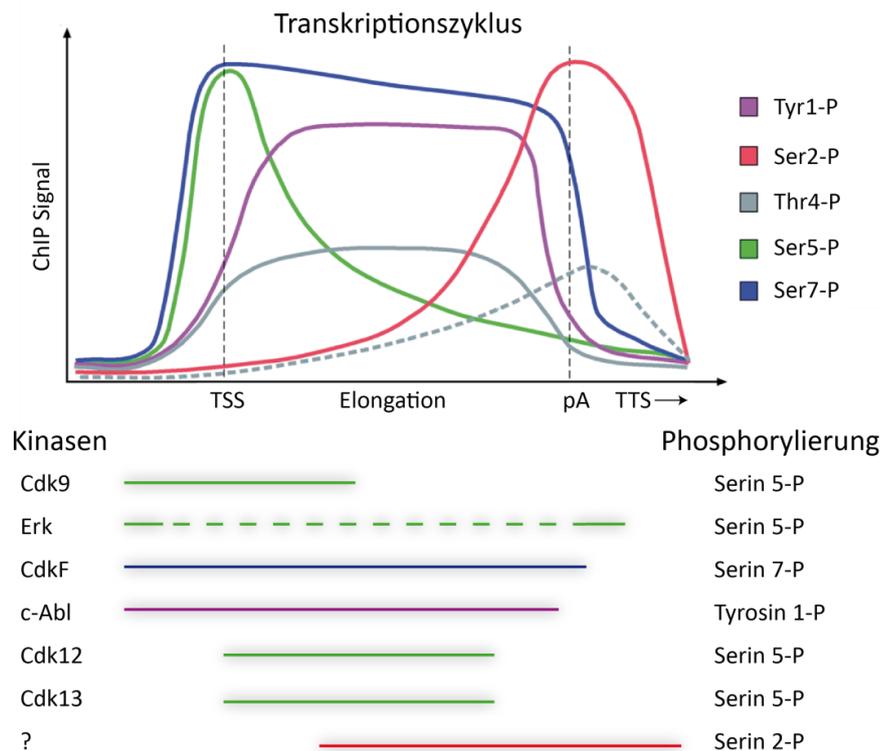


Abbildung 5.2: Überblick über die Phosphorylierungen und die daran beteiligten Kinasen im Transkriptionszyklus

Änderung der CTD Modifizierung entlang der Transkription eines Genes in *S. cerevisiae*. Das ChIP-Signal entspricht der Anreicherung der jeweiligen Unterformen im Verlauf eines Genes (Eick and Geyer, 2013). Die Kinasen, die in dem jeweiligen Abschnitt des Transkriptionszyklus eine Rolle spielen könnten, sind unten dargestellt und farblich ihrer Spezifität zugeordnet.

Nach der Initiation pausiert die Transkription bevor sie in die Elongationsphase eintritt. Diese Unterbrechung wird für das RNA-Capping benötigt und könnte einer verzögerten CTD-Phosphorylierung durch Cdk9 zugeschrieben werden. Die anfängliche Phosphorylierung durch Cdk9 ist nämlich ein langsamer Prozess, während die darauffolgende Addition von Phosphatgruppen wesentlich schneller vorangeht (Marshall et al., 1996; Pinhero et al., 2004). P-TEFb ist in den *in vitro* Assays deutlich aktiver als Cdk12 und Cdk13, was für eine langsamere Phosphorylierung und spezifischere Phosphorylierung durch Cdk12 und Cdk13 spricht. Cdk12 beispielsweise kann eine CTD mit 3 Wiederholungen nur einmal phosphorylieren, wohingegen P-TEFb in der Lage ist, ein CTD Substrat stöchiometrisch zu phosphorylieren, also die gleiche Anzahl an Phosphorylierungen setzen kann wie Wiederholungen der CTD vorhanden sind. Die Abnahme der Serin 5 Phosphorylierung geht einher mit der Zunahme der Serin 2 Phosphorylierung. Da P-TEFb mit der Transkriptionsinitiation verbunden ist und auf einer pSer2 markierten CTD – die zur Transkriptionstermination hin zunimmt – keine Aktivität zeigt, kann die Hypothese, dass P-TEFb eine Serin 5 Kinase ist, bestärkt werden. Dies zeigt, dass P-TEFb nur während der Initiation und Elongation aktiv bleibt. Experimente mit rekombinantem oder immunpräzipitiertem P-TEFb bestätigten Cdk9 als Ser5 CTD Kinase (Czudnochowski et

al., 2012). Eine ähnliche Beobachtung wurden anhand von *in vivo imaging-live* Experimente der RNAP II Transkriptionsmaschinerie in Primärzellen gemacht, bei denen Cdk9 colokalisierte mit einer pSer5-Markierung und nicht mit einer pSer2-Markierung (Ghamari et al., 2013). Chromatin Immunpräzipitationstests gekoppelt mit Sequenzierungen (ChIP-Seq) zeigten, dass die Genom-weiten Untersuchungen zu Cdk9 einhergehen mit einer RNAP II Ser5 Phosphorylierung, mit der höchsten Anreicherung am 5'-Ende des Gens (Ghamari et al., 2013).

Zudem zeigen P-TEFb, Cdk12 und Cdk13 eine hohe Aktivität auf einem Serin 7 vorphosphorylierten Substrat. Dies spricht für einen konsekutiven Mechanismus der gewährleistet sein muss, da während der Initiation der Transkription die CTD auch an Serin 7 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung könnte neben P-TEFb auch von Cdk12 und Cdk13 erkannt werden und ihr Aktivität anregen.

P-TEFb zeigt auf einem Substrat mit pSer2 Markierung keine Aktivität, die Kinasen Cdk12 und Cdk13 weisen hingegen eine geringe Aktivität auf. So würde P-TEFb nur aktiv sein, bis die für die Termination benötigte Serin 2 Phosphorylierung einsetzt, was ca. der ersten Hälfte des Transkriptionszyklus entspricht. Cdk12 und Cdk13 könnten aufgrund der geringen Aktivität auf einer an Serin 2 vorphosphorylierten CTD die RNAP II CTD darüber hinaus phosphorylieren.

Sobald die Serin 2 Phosphorylierung einsetzt, könnten Erk1 und Erk2 die Phosphorylierung weiter unterstützend durchführen. Diese Kinasen zeigten ihre höchste Aktivität auf einem Serin 2 vorphosphorylierten Substrat und führten auf einem pSer7 Substrat kaum Phosphorylierungen durch. Diese Spezifität könnte ein Hinweis darauf sein, dass Erk seine Aktivität zu Beginn des Zyklus und während des zweiten Teils der Transkription ausübt, wenn die Serin 7 Phosphorylierung leicht abnimmt (Abbildung 5.2).

Cdk12 und Cdk13 können keine CTD Wiederholungssequenz phosphorylieren, die ein Lysin an Position 7 enthält. Diese Abweichung von der consensus Sequenz der CTD kommt überwiegend am C-terminalen Ende der RNAP II CTD vor. Cdk12 und Cdk13 zeigten auf den Peptidsubstraten keine Direktionalität und können nur die proximalen CTD Wiederholungen phosphorylieren. Cdk9 und Erk hingegen zeigen gegenüber den distalen CTD Wiederholungen eine geringe Aktivität (diese Studie; Pinhero et al., 2004; Ramanathan et al., 2001). Da für P-TEFb und Erk eine Präferenz für eine Phosphorylierungsreaktion in Richtung des N-terminalen Endes einer CTD mit drei Wiederholungen gefunden wurde, können diese Kinasen ihre Aktivität direkt vom distalen Ende der CTD zum N-terminalen Ende hin ausüben, während Cdk12 und Cdk13 das proximale Ende der CTD phosphorylieren und sich an bestehenden Serin 7 Phosphorylierungen orientieren. Diese Präferenzen könnten einen weiteren Regulationsmechanismus für die CTD Phosphorylierung aufweisen. Eine Funktion als Serin 2 Kinase, die sowohl mit der Transkriptionstermination, als auch mit dem Spleißprozess und der 3'-Prozessierung assoziiert ist, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keiner Kinase zugeordnet werden.

Die verschiedenen Substratspezifitäten der Kinasen können teilweise mit der elektrostatischen Oberflächeneigenschaften der Cdk/Cyclin-Komplexe, die mit den negativ geladenen vorphosphorylierten CTD Substraten interagieren können, in Verbindung gebracht werden (Abbildung 5.3).

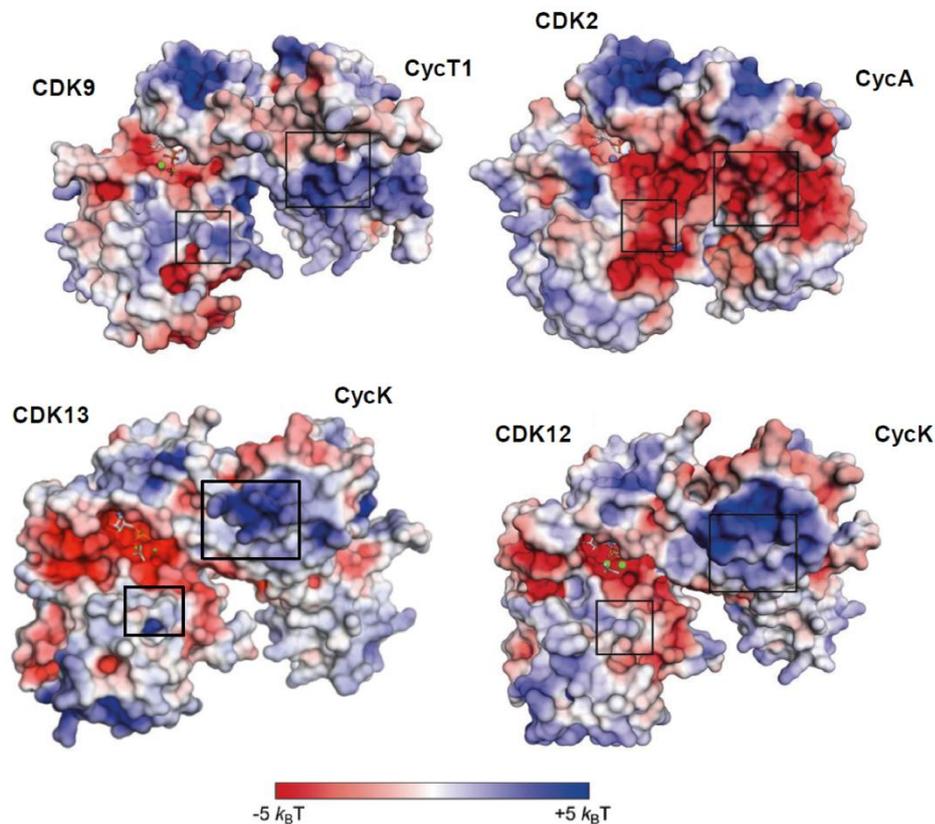


Abbildung 5.3: Vergleich der elektrostatischen Oberflächen zwischen Transkriptionskinasen und einer Zellzykluskinase

Die elektrostatischen Oberflächen von Cdk13/CycK, Cdk12/CycK (Bösken et al., 2014), Cdk9/CycT1 (PDB:3BLQ; Baumli et al., 2008), Cdk2/CycA (PDB: 1JST; Russo et al., 1996) sind von $-5 k_B T$ (rot) bis $5 k_B T$ (blau) abgebildet. Basische Oberflächen, die sich sowohl auf der Kinase als auch auf dem Cyclin befinden, könnten die Interaktion mit dem vorphosphoryliertem CTD Substrat ermöglichen. Umrandete Bereiche auf Cdk- und Cyclin-Einheit sind mögliche Kontaktflächen für das CTD Substrat (Hönig, 2013).

Der Zellzyklus, der unter anderem von dem Cdk2/CycA-Komplex reguliert wird, weist eine weitgehend saure Oberfläche am aktiven Zentrum auf und erklärt die Präferenz für ein SPx(K/R) Substrat in der Kinase und ein RxL Motiv auf der Cyclin Untereinheit (Brown et al., 1999). Dem gegenüber steht eine geringe Aktivität von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK auf eine unphosphorylierte CTD, da die elektrostatische Oberfläche eher basische Aminosäurereste aufweisen. Diese könnte an einer Interaktion mit negativ-geladenen Aminosäureresten der vorphosphorylierten CTD involviert sein. Diese unterschiedlich geladenen Oberflächen könnten daher eine zusätzliche Ebene der Regulierung darstellen, in der beispielsweise Cdk12 und Cdk13 nur geringfügig in der Lage sind, die CTD im Prä-

Initiationsschritt zu phosphorylieren, so dass andere Kinasen die erste Phosphorylierungsmarkierung setzen müssen, bevor Cdk12 und Cdk13 die CTD als richtiges Substrat erkennen (Abbildung 5.2).

Zusätzlich zu den Phosphorylierungen kann die CTD auch glykosyliert werden (Kelly et al., 1993). Durch anhängen eines N-Acetylglucosamin-Monosaccharides (O-GlcNAc) an die Hydroxygruppen der Serin- und Threoninseitenketten könnte diese Modifikation ebenfalls eine Rolle bei der Erkennung der CTD durch unterschiedliche Faktoren spielen. Zudem können manche Kombinationen einander positiv beeinflussen oder sich gegenseitig ausschließen. So konnte bislang noch keine Kombination der Glykosylierung und der Phosphorylierung nachgewiesen werden. Somit könnte die Glykosylierung für die Rekrutierung der RNAP II an den Promotor verantwortlich sein und die Phosphorylierung erst einsetzen, wenn die O-GlcNAc-Gruppe selektiv entfernt wurde. Dies würde einem weiteren Kontrollmechanismus der Transkription entsprechen. Allerdings konnte noch keine Funktion der Glykosylierung während der Transkription gefunden werden, die eine funktionelle Erweiterung des 'CTD-Codes' darstellen könnten.

In dieser Arbeit wurden teilweise Antikörper-basierte Methoden eingesetzt, deren Grenzen klar definiert sind. Die Signalstärke der Western Blot-Analysen hängt allein von der Anzahl der zugänglichen CTD Modifizierungen und nicht von der Anzahl der physikalischen Markierungen der CTD ab. Zudem kann das Fehlen einer CTD Markierung entweder auf die Abwesenheit der Modifikation oder auf eine alternative Markierung der CTD durch andere Modifikationen hinweisen. Einerseits kann nicht die Anzahl der Epitope, noch die Abhängigkeit der Modifikation von anderen unterschieden werden. Andererseits kann die Lage der Phosphorylierung auf der CTD – wie schon die grobe Unterteilung in distale oder proximale Bereiche – nicht detektiert werden. Andere Techniken wie NMR- und Kristallstrukturanalysen sind nicht geeignet für die Analyse der komplexen CTD und deren Änderungen. In einer Säugerzelle beispielsweise sind etwa 100.000 RNAP II Moleküle enthalten und jede CTD dieser Moleküle hat 236 potentielle Phosphorylierungsstellen (Eick and Geyer, 2013). Jede kleinste Funktionseinheit (Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7-Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4) enthält acht potentielle Phosphorylierungsstellen und in Kombination mehrere Hunderte verschiedene Phosphorylierungsmuster. Allein diese große Anzahl scheint es unmöglich zu machen, das Modifikationsmuster der gesamten CTD als Ganzes zu analysieren.

Eine Lösung für diese Probleme könnten analytische Methoden von RNAP II Molekülen und ihrer CTD liefern. In dieser Arbeit wurden kleine Peptide entworfen, die einen Startpunkt für diese Methode liefern. Der distale Teil der CTD könnte dabei leichter untersucht werden, da dieser Abschnitt der CTD viele Abweichungen von der consensus Sequenz enthält, wodurch die Wiederholungseinheiten individuell leichter zu identifizieren sind. Der proximale CTD Teil besteht hauptsächlich aus consensus Wiederholungen, bei denen es schwieriger ist die Modifikationen spezieller Wiederholungen aufgrund ihrer repetitiven Sequenz zuzuordnen. Derzeit ist es völlig unklar, wie viele der möglichen Aminosäuren in einer einzigen Funktionseinheit gleichzeitig phosphoryliert werden können.

Weiter bestehen keine Erkenntnisse über das Vorkommen und die Häufigkeit der Phosphorylierungen im distalen oder proximalen Teil der CTD. Es ist wichtig mehr über den Phosphorylierungsablauf in der CTD zu wissen, um in der Lage zu sein, die Art des CTD Ablaufs und ihre beeinflussenden Faktoren zu analysieren, da die weitere Entschlüsselung des 'CTD-Codes' und die Verbindung mit dem Transkriptionszyklus einen Baustein für die Erforschung neuer Angriffspunkte gegen verschiedene Krankheiten darstellt.

5.3 Inhibitoren der Transkriptionselongationskinasen

Flavopiridol ist kein exklusiver Inhibitor für P-TEFb

Flavopiridol gilt als der potentester Inhibitor für die Transkriptionskinasen Cdk9 und Cdk12. Für Cdk9 wurde Flavopiridol als ein spezifischer Kinaseinhibitor beschrieben (Baumli et al., 2008). Seine Wirkung als ATP-kompetitiver Inhibitor wurde auch für Cdk12 nachgewiesen (Bösken et al., 2014). Dabei inhibiert Flavopiridol Cdk12 um ein 10-faches schlechter als Cdk9/CycT1. Mögliche Gründe für die schlechtere Inhibierung ergeben sich aus der räumlichen Nähe der C-terminalen Verlängerung zum aktiven Zentrum, die die Affinität des Inhibitors verringern könnten. Dennoch ist die ausschließliche Spezifität von Flavopiridol zu P-TEFb in Frage zu stellen, da ebenfalls eine Inhibition von Cdk13/CycK und Cdk7/CycH durch Flavopiridol in dieser Arbeit identifiziert wurde. Die Daten demonstrieren, dass eine generelle Wirksamkeit von Flavopiridol auch für andere Transkriptionselongations-kinasen besteht. Die Inhibition von anderen transkriptionsbezogenen Kinasen durch Flavopiridol konnte bestätigt werden und stellt die Relevanz von Flavopiridol in Frage. Cdk9 wird von Cdk7 im Aktivierungssegment phosphoryliert (Larochelle et al., 2012). Durch die Inhibition von Cdk7 durch Flavopiridol erfolgt demnach keine Phosphorylierung von Cdk9. Daher könnten Ergebnisse aus *in vivo* Studien zu P-TEFb mit Flavopiridol fehlinterpretiert worden sein und zu falschen Rückschlüssen bezüglich der tatsächlichen Aktivität der Kinasen führen. Jedoch sind die phänomenologischen Beobachtungen der *in vivo* Studien zutreffend.

Flavopiridol wird standardmäßig für die Inhibition von P-TEFb verwendet. Der Wirkstoff ist aber nicht exklusiv für diese Kinase, da Flavopiridol die komplette Transkription ausschaltet. Diese Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe um Dalibor Blazek, Brno (Tschechien), bestätigt, der es mit Hilfe unserer rekombinanten Kinasen Cdk9, Cdk12 und Cdk13 und Knockdown-Experimenten der endogenen Kinasen gelungen ist, nachzuweisen, dass keine Phosphorylierung der RNAP II CTD *in vivo* nach Inhibition mit Flavopiridol vorliegt. Die Hypothese, dass durch Flavopiridol neben P-TEFb andere Transkriptionskinasen ausgeschaltet werden, konnte dadurch bestätigt werden.

In Strukturmodellen zu Cdk13 mit Flavopiridol konnte – wie in Cdk12 Studien zuvor – eine lokale Überschneidung von Flavopiridol mit dem C-terminalen Fortsatz von Cdk13 gefunden werden, welche die Affinität von Flavopiridol zur ATP-Bindungstasche

herabsetzt. Das DCHEL-Motiv von Cdk13, insbesondere das HE-Motiv an Position 1018-1019 gefolgt von einem polybasischen Cluster, ist essentiell für die Aktivität der Kinase. Anhand der Struktur kann man deutlich erkennen, dass die Konformation des Histidins die Bindung von Flavopiridol stört. So könnte die geringere Inhibition von Cdk13/CycK durch Flavopiridol im Gegensatz zu P-TEFb erklärt werden.

Für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren gegen die Transkriptionselongationskinasen könnten die gelösten Strukturmodelle einen großen Beitrag leisten. Unter Zuhilfenahme der strukturellen Eigenschaften können spezifische Inhibitoren entwickelt werden.

Dinaciclib als neuer und besserer Inhibitor für Transkriptionskinasen

In dieser Studie konnte durch Dinaciclib eine sehr starke Inhibition von Cdk9/CycT1, Cdk12/CycK und Cdk13/CycK erreicht werden mit IC_{50} Werten von 19,33 nM für Cdk9/CycT1, 61,8 nM für Cdk12/CycK und 87,4 nM für Cdk13/CycK. Dabei zeigte sich, dass Dinaciclib ein etwa dreifach besserer Inhibitor für Cdk9/CycT1 ist als für die Kinasen Cdk12/CycK und Cdk13/CycK. Die Daten demonstrieren die hohe Wirksamkeit von Dinaciclib für die Transkriptionselongationskinasen Cdk9/CycT1, Cdk12/CycK und Cdk13/CycK. Die Inhibition der Cdk12 und Cdk13 Kinasen durch Dinaciclib entspricht einer ähnlichen Größenordnung und ist auf die sehr ähnliche Struktur der Kinasen zurückzuführen. Anhand von Überlagerungen der Strukturen von Cdk2 Cdk9/CycT1•Dinaciclib und Cdk9/CycT1•Flavopiridol mit Cdk13/CycK, Cdk2•Dinaciclib und Cdk9/CycT1•Flavopiridol und Cdk12/CycK sowie Cdk2•Dinaciclib mit Cdk9/CycT1•Flavopiridol konnte die Bindung von Dinaciclib und Flavopiridol ins aktive Zentrum der Kinasen modelliert werden (Abbildung 5.4).

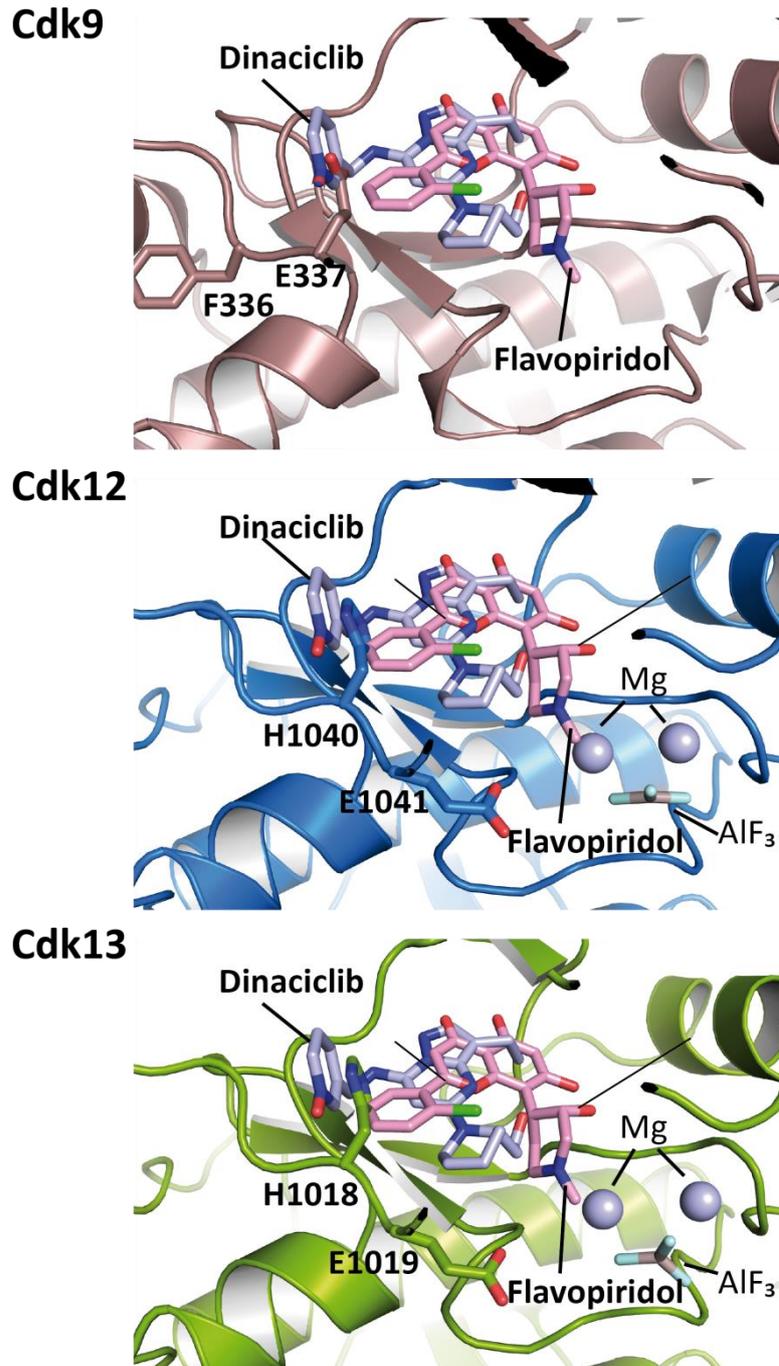


Abbildung 5.4: Darstellung von Flavopiridol und Dinaciclib im aktiven Zentrum von Cdk9, Cdk12 und Cdk13

A: Das aktive Zentrum von Cdk9 mit Flavopiridol ist dargestellt (PDB: 4EC8; Baumli et al., 2008). Die Bindung von Dinaciclib im aktiven Zentrum der Kinase Cdk9 wurde durch die Überlagerung von Cdk9 mit Cdk2•Dinaciclib (PDB: 4KD1; Martin et al., 2013) modelliert. Zu bemerken ist, dass Cdk9 im C-terminalen Bereich trunziert ist und nicht das HE-Motiv enthält. **B:** Die Bindung von Dinaciclib im aktiven Zentrum der Kinase Cdk12 (PDB: 4NST; Bösen et al., 2014) wurde durch die Überlagerung von Cdk2•Dinaciclib modelliert und die Bindung von Flavopiridol durch die Überlagerung von Cdk9/CycT1•Flavopiridol (PDB: 3BLR). **C:** Die Bindung von Dinaciclib im aktiven Zentrum der Kinase Cdk13 wurde durch die Überlagerung von Cdk2•Dinaciclib modelliert und die Bindung von Flavopiridol durch die Überlagerung von Cdk9/CycT1•Flavopiridol (PDB: 3BLR).

Für Flavopiridol konnte im Vergleich zu Dinaciclib eine sterische Hinderung mit dem Histidin im C-terminalen Fortsatz der Kinasen Cdk12 und Cdk13 gefunden werden. Anhand der Modelstruktur kann man den besseren Fit von Dinaciclib ins aktive Zentrum der Kinasen erkennen. Hier könnte eine leichte Drehung des Loops zu einer Verstärkung der Interaktion zwischen Dinaciclib und der Kinaseuntereinheit führen.

Neben der Inhibition der Phosphorylierung der Transkriptionskinasen wurde auch eine Inhibition der Zellzykluskinasen Cdk1 und Cdk2, sowie der Cdk5 Kinase durch Dinaciclib beschrieben (Parry et al., 2010). Dinaciclib inhibiert die Reaktion auf die Anhäufung von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen (UPR, engl.: *unfolded protein response*) im Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (Desai et al., 2013; Nguyen and Grant, 2014). Zudem konnte eine Antitumorwirkung von Dinaciclib in Melanomen, bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), bei Bauchspeicheldrüsenkrebs und in Osteosarkomen gefunden werden. Dabei ist die Aktivität auf fehlgefaltete Protein abhängig von der p53-Signalisierung (Desai et al., 2013), sie fördert in chronischen, lymphatischen Leukämiezellen die Apoptose und hebt den mikroumgebenden Cytokinschutz auf (Johnson et al., 2012). Bei Bauchspeicheldrüsenkrebs wird das Krebswachstum und die Progression in murinen Xenotransplantatmodellen gehemmt (Feldmann et al., 2011), zudem induziert Dinaciclib im Osteosarkom die Apoptose von Osteosarkom-Zellen und in Kombination mit einem Hitzeschockprotein-90-Inhibitor die Apoptose von Osteosarkom-Kulturen (Fu et al., 2013). Diese Bandbreite an Wirkeigenschaften von Dinaciclib macht dieses Molekül zu einem therapeutisch wertvollen Inhibitor, der in Zukunft *in vivo* weiter untersucht werden sollte. Die Analysen dieser Arbeit könnten auf zellbiologischer, strukturbiologischer und sogar angewandter Ebene vervollständigt werden.

5.4 Krankheitsbezug

Die Fehlregulation der Transkription, insbesondere der daran beteiligten Kinasen, wird zunehmend als Ursache für ein breites Spektrum von Krankheiten und Veränderungen verantwortlich gemacht (Lee and Young, 2013; Wang and Fischer, 2008). Die Regulation der Expression und der Aktivität verschiedener Kinasen prädisponiert mit menschlichen Krankheiten (Krystof et al., 2012; Wang and Fischer, 2008). Über- oder Unterexpression von Cdks und ihrer Cycline, die den Zellzyklus regulieren, wurden in einer Vielzahl von Tumoren und proliferativen Erkrankungen beobachtet, darunter Melanomen (Abdullah et al., 2011), multiplum Myelom (McMillin et al., 2011), hypophyse Adenome und Karzinome (Quereda and Malumbres, 2009), chronischer lymphatischer Leukämie (Hahntow et al., 2004) und andere malignen Erkrankungen (Johnson and Shapiro, 2010). Dabei konnte beispielsweise Mutationen der Kinase Cdk12 in genomischen Analysen in Verbindung mit Eierstock-, Brust- und Lungenkarzinom und Melanom gebracht werden (Kan et al., 2010; Kohoutek and Blazek, 2012; Wei et al., 2011). P-TEFb, das eine zentrale Rolle in der Transkription einnimmt, konnte in Zusammenhang mit zahlreichen pathologischen

Prozessen wie der kardialen Hypertrophie gebracht werden. Dabei führt ein von P-TEFb-vermittelter krankhafter Anstieg der mRNA- und Proteinlevel zur Vergrößerung der Herzmuskelzellen und stellt so einen zentralen Risikofaktor für eine kongestive Herzinsuffizienz dar (Krystof et al., 2010; Sano et al., 2002). Diese Feststellungen haben das Interesse an der Entwicklung neuer Antikrebsmittel gegen Cdk9 angetrieben. Dabei stellt der C-terminale Fortsatz der Transkriptionselongationskinasen Cdk12 und Cdk13, der mit der Bindung des ATP Substrat assoziiert ist, die Grundlage für die spezifische Entwicklung von Inhibitoren dar.

Die Entdeckung von Cdk12/CycK und Cdk13/CycK als Elongationskinasen ermöglicht die Entwicklung neuer spezifischer Inhibitoren sowohl für therapeutische als auch für wissenschaftliche Zwecke. In diesem Zusammenhang wurde der Inhibitor Dinaciclib untersucht, der eine hohe Wirksamkeit gegenüber Cdk12, Cdk13 und Cdk9 aufwies. Die Daten bezüglich Flavopiridol widerlegen Flavopiridol als ausschließlichen Inhibitor gegen Cdk9 und stellen seine spezifische Wirksamkeit in Frage.

Mit der Identifizierung der großen P-TEFb-Komplexe – Hexim/7SKsnRNA, Tat/TAR, AFF4 und Brd4 – , die ein funktionierendes Netzwerk für die Kontrolle von HIV und der zellulären Genexpression bilden, sind wir in der Lage Angriffspunkte aufzuweisen, um Krankheiten wie HIV/AIDS und Krebsarten zu behandeln. Die Reduktion der Hexim-Expression in Brustkrebszellen führt zu einer Stimulation der Transkription und Zellproliferation (Wittmann et al., 2005; Wittmann et al., 2003). HIV-1 nutzt die Interaktion zwischen P-TEFb und dem viralen Transkriptionsaktivator Tat, um am viralen Promoter die Synthese von vollständigen HIV-1 Transkripten zu stimulieren und so die virale Replikation zu gewährleisten (Mancebo et al., 1997; Ott et al., 2011; Wei et al., 1998; Zhu et al., 1997a). Translokationen des *MLL*-Gens können darüber hinaus zu Proteinchimären führen, die unter anderem mit ELL und P-TEFb als sogenannte Superelongationskomplexe die Transkription von *HOX* Genen stimulieren. Eine derartige Fehlregulation der Transkriptionselongation führt zu einer akuten Form der Leukämie, der sogenannten *mixed lineage leukemia* (Lin et al., 2010; Luo et al., 2012; Mueller et al., 2007; Mueller et al., 2009). Das Bromodomänen enthaltene Protein Brd4 wurde beispielsweise als therapeutisches Ziel in akuter myeloische Leukämie, multiplem Myelom, Burkitt-Lymphom, NUT midline Karzinom, Dickdarmkrebs, Brustkrebs und Entzündungserkrankungen identifiziert (Delmore et al., 2011; French et al., 2003; Mertz et al., 2011; Nicodeme et al., 2010; Rodriguez et al., 2012; Zuber et al., 2011) und stellt einen Angriffspunkt für neue Therapeutika dar.

Daher ist die Aufklärung der Mechanismen von großer Bedeutung. Anhand von Struktur-Funktions-Analysen wichtiger Komplexe können wir die Zusammensetzung untersuchen und die Schnittpunkte der Interaktionen der Proteine bestimmen. Zudem können wir anhand biophysikalischer und biochemischer Methoden die Aktivitäten von Kinasen und deren positiv und negativ regulierenden Faktoren erforschen.

Das Protoonkogen c-Myc, dessen Überexpression in vielen Krebsarten gefunden wurde (Eilers et al., 2008) konnte als Substrat der Transkriptionskinasen identifiziert werden und

stellt einen weitere potentiellen Angriffspunkt gegen Krankheiten dar. Die Entschlüsselung des 'CTD-Codes' erfordert das Verstehen der kombinierbaren Möglichkeiten der Modifikationen, deren Erkennung und Ausschluss in räumlicher und zeitlicher Weise, um diese transienten Änderungen mit dem Transkriptionszyklus von verschiedenen Genen zu verbinden (Buratowski, 2009; Corden, 2013). Die in dieser Arbeit vorgenommene Bestimmung der unterschiedlichen Substratspezifitäten und Enzymaktivitäten der Kinasen Cdk9, Cdk12, Cdk13, CdkF und Erk ist ein erster Schritt, um ihre Beteiligung für die Variabilität der CTD Phosphorylierungen nachzuvollziehen. Die Identifizierung von regulierenden Faktoren stellt den nächsten Schritt dar, um die Funktionsweise und Regulation der Transkriptionselongation zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdullah, C., Wang, X., and Becker, D. (2011). Expression analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinases in advanced melanoma. *Cell cycle* *10*, 977-988.
- Abremski, K., and Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *The Journal of biological chemistry* *259*, 1509-1514.
- Abremski, K., Hoess, R., and Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* *32*, 1301-1311.
- Adams, J.A. (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical reviews* *101*, 2271-2290.
- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* *6*, 635-645.
- Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., *et al.* (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* *123*, 409-421.
- Akhtar, M.S., Heidemann, M., Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Chapman, R.D., Eick, D., and Ansari, A.Z. (2009). TFIIF kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* *34*, 387-393.
- Alvarez, E., Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Latour, D.A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., and Davis, R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *The Journal of biological chemistry* *266*, 15277-15285.
- Anand, K., Schulte, A., Vogel-Bachmayr, K., Scheffzek, K., and Geyer, M. (2008). Structural insights into the cyclin T1-Tat-TAR RNA transcription activation complex from EIAV. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 1287-1292.
- Asturias, F.J., Jiang, Y.W., Myers, L.C., Gustafsson, C.M., and Kornberg, R.D. (1999). Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* *283*, 985-987.
- Aubol, B.E., Plocinik, R.M., Hagopian, J.C., Ma, C.T., McGlone, M.L., Bandyopadhyay, R., Fu, X.D., and Adams, J.A. (2013). Partitioning RS domain phosphorylation in an SR protein through the CLK and SRPK protein kinases. *Journal of molecular biology* *425*, 2894-2909.
- Avruch, J. (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochimica et biophysica acta* *1773*, 1150-1160.
- Baillat, D., Hakimi, M.A., Naar, A.M., Shilatifard, A., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell* *123*, 265-276.
- Bao, Z.Q., Jacobsen, D.M., and Young, M.A. (2011). Briefly bound to activate: transient binding of a second catalytic magnesium activates the structure and dynamics of CDK2 kinase for catalysis. *Structure* *19*, 675-690.

- Barboric, M., Kohoutek, J., Price, J.P., Blazek, D., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (2005). Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *EMBO J* 24, 4291-4303.
- Barboric, M., Yik, J.H., Czudnochowski, N., Yang, Z., Chen, R., Contreras, X., Geyer, M., Matija Peterlin, B., and Zhou, Q. (2007). Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic acids research* 35, 2003-2012.
- Barrero, R.A., Umeda, M., Yamamura, S., and Uchimiya, H. (2002). Arabidopsis CAP regulates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division. *The Plant cell* 14, 149-163.
- Bartkowiak, B., and Greenleaf, A.L. (2011). Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb? *Transcription* 2, 115-119.
- Bartkowiak, B., Liu, P., Phatnani, H.P., Fuda, N.J., Cooper, J.J., Price, D.H., Adelman, K., Lis, J.T., and Greenleaf, A.L. (2010). CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev* 24, 2303-2316.
- Baskaran, R., Chiang, G.G., Mysliwiec, T., Kruh, G.D., and Wang, J.Y. (1997). Tyrosine phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by the Abl-related gene product. *J Biol Chem* 272, 18905-18909.
- Baskaran, R., Chiang, G.G., and Wang, J.Y. (1996). Identification of a binding site in c-Abl tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 16, 3361-3369.
- Baskaran, R., Dahmus, M.E., and Wang, J.Y. (1993). Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11167-11171.
- Baskaran, R., Escobar, S.R., and Wang, J.Y. (1999). Nuclear c-Abl is a COOH-terminal repeated domain (CTD)-tyrosine (CTD)-tyrosine kinase-specific for the mammalian RNA polymerase II: possible role in transcription elongation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 10, 387-396.
- Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.E., Laramée, L., Fortin, M.E., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D., and Robert, F. (2012). A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Molecular cell* 45, 158-170.
- Baumli, S., Hole, A.J., Noble, M.E., and Endicott, J.A. (2012). The CDK9 C-helix exhibits conformational plasticity that may explain the selectivity of CAN508. *ACS chemical biology* 7, 811-816.
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E.D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A.N., Debreczeni, J.E., Knapp, S., and Johnson, L.N. (2008). The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO J* 27, 1907-1918.
- Bellier, S., Chastant, S., Adenot, P., Vincent, M., Renard, J.P., and Bensaude, O. (1997). Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. *EMBO J* 16, 6250-6262.
- Bentley, D.L. (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* 17, 251-256.
- Berger, I., Fitzgerald, D.J., and Richmond, T.J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat Biotechnol* 22, 1583-1587.

- Bernard, A., Payton, M., and Radford, K.R. (2001). Protein expression in the baculovirus system. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5, Unit 5*.
- Bieniasz, P.D., Grdina, T.A., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (1999). Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 7791-7796.
- Bieniossek, C., Imasaki, T., Takagi, Y., and Berger, I. (2012). MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* *37*, 49-57.
- Bieniossek, C., Richmond, T.J., and Berger, I. (2008). MultiBac: multigene baculovirus-based eukaryotic protein complex production. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5, Unit 5* 20.
- Bigalke, J.M., Dames, S.A., Blankenfeldt, W., Grzesiek, S., and Geyer, M. (2011). Structure and dynamics of a stabilized coiled-coil domain in the P-TEFb regulator Hexim1. *Journal of molecular biology* *414*, 639-653.
- Bisgrove, D.A., Mahmoudi, T., Henklein, P., and Verdin, E. (2007). Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13690-13695.
- Biswas, D., Milne, T.A., Basrur, V., Kim, J., Elenitoba-Johnson, K.S., Allis, C.D., and Roeder, R.G. (2011). Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 15751-15756.
- Bitomsky, N., Bohm, M., and Klempnauer, K.H. (2004). Transformation suppressor protein Pcd4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun. *Oncogene* *23*, 7484-7493.
- Blazek, D. (2012). The cyclin K/Cdk12 complex: an emerging new player in the maintenance of genome stability. *Cell Cycle* *11*, 1049-1050.
- Blazek, D., Kohoutek, J., Bartholomeeusen, K., Johansen, E., Hulinkova, P., Luo, Z., Cimernancic, P., Ule, J., and Peterlin, B.M. (2011). The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes & development* *25*, 2158-2172.
- Boeing, S., Rigault, C., Heidemann, M., Eick, D., and Meisterernst, M. (2010). RNA polymerase II C-terminal heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is established in a mediator-dependent fashion. *The Journal of biological chemistry* *285*, 188-196.
- Bonnet, F., Vigneron, M., Bensaude, O., and Dubois, M.F. (1999). Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic acids research* *27*, 4399-4404.
- Bose, P., Simmons, G.L., and Grant, S. (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor therapy for hematologic malignancies. *Expert opinion on investigational drugs* *22*, 723-738.
- Bösken, C.A., Farnung, L., Hintermair, C., Merzel Schachter, M., Vogel-Bachmayr, K., Blazek, D., Anand, K., Fisher, R.P., Eick, D., and Geyer, M. (2014). The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nature communications* *5*, 3505.
- Bösken, C.A. (2013). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der transkriptionsregulierenden Kinasen Cdk9 und Cdk12. Doktorarbeit.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bres, V., Yoh, S.M., and Jones, K.A. (2008). The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol* 20, 334-340.
- Brown, N.R., Noble, M.E., Endicott, J.A., and Johnson, L.N. (1999). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1, 438-443.
- Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nature structural biology* 10, 679-680.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular cell* 36, 541-546.
- Burton, Z.F. (2014). The Old and New Testaments of gene regulation: Evolution of multi-subunit RNA polymerases and co-evolution of eukaryote complexity with the RNAP II CTD. *Transcription* 5.
- Bushnell, D.A., Westover, K.D., Davis, R.E., and Kornberg, R.D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Angstroms. *Science* 303, 983-988.
- Byun, J.S., Fufa, T.D., Wakano, C., Fernandez, A., Haggerty, C.M., Sung, M.H., and Gardner, K. (2012). ELL facilitates RNA polymerase II pause site entry and release. *Nature communications* 3, 633.
- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859-869.
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T., and Lamond, A.I. (1992). Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *The Journal of cell biology* 117, 1-14.
- Chao, S.H., Fujinaga, K., Marion, J.E., Taube, R., Sausville, E.A., Senderowicz, A.M., Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2000). Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *The Journal of biological chemistry* 275, 28345-28348.
- Chao, S.H., and Price, D.H. (2001). Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *The Journal of biological chemistry* 276, 31793-31799.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Albert, T.K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318, 1780-1782.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends in genetics : TIG* 24, 289-296.
- Chen, H.H., Wang, Y.C., and Fann, M.J. (2006). Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Molecular and cellular biology* 26, 2736-2745.
- Chen, H.I., and Sudol, M. (1995). The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7819-7823.
- Chen, R., Yang, Z., and Zhou, Q. (2004). Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA. *The Journal of biological chemistry* 279, 4153-4160.

- Cheng, K.Y., Noble, M.E., Skamnaki, V., Brown, N.R., Lowe, E.D., Kontogiannis, L., Shen, K., Cole, P.A., Siligardi, G., and Johnson, L.N. (2006). The role of the phospho-CDK2/cyclin A recruitment site in substrate recognition. *The Journal of biological chemistry* *281*, 23167-23179.
- Chiba, K., Yamamoto, J., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2010). Promoter-proximal pausing and its release: molecular mechanisms and physiological functions. *Experimental cell research* *316*, 2723-2730.
- Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O., and Reinberg, D. (1999). A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes & development* *13*, 1540-1552.
- Cho, S., Schroeder, S., Kaehlcke, K., Kwon, H.S., Pedal, A., Herker, E., Schnoelzer, M., and Ott, M. (2009). Acetylation of cyclin T1 regulates the equilibrium between active and inactive P-TEFb in cells. *EMBO J* *28*, 1407-1417.
- Cho, S., Schroeder, S., and Ott, M. (2010). CYCLINg through transcription: posttranslational modifications of P-TEFb regulate transcription elongation. *Cell cycle* *9*, 1697-1705.
- Chou, S., Upton, H., Bao, K., Schulze-Gahmen, U., Samelson, A.J., He, N., Nowak, A., Lu, H., Krogan, N.J., Zhou, Q., *et al.* (2013). HIV-1 Tat recruits transcription elongation factors dispersed along a flexible AFF4 scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, E123-131.
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* *4*, E127-130.
- Coin, F., and Egly, J.M. (1998). Ten years of TFIIF. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* *63*, 105-110.
- Corden, J.L. (2013). RNA polymerase II C-terminal domain: Tethering transcription to transcript and template. *Chemical reviews* *113*, 8423-8455.
- Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2007). The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. *Molecular and cellular biology* *27*, 2059-2073.
- Cramer, P. (2004). Structure and function of RNA polymerase II. *Advances in protein chemistry* *67*, 1-42.
- Cramer, P., Armache, K.J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G.E., Dengl, S., Geiger, S.R., Jasiak, A.J., *et al.* (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annual review of biophysics* *37*, 337-352.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* *292*, 1863-1876.
- Czudnochowski, N. (2009). Biochemische Untersuchungen zur Regulation der Transkriptionselongation durch Hexim und 7SK snRNA. In Fakultät für Chemie (Dortmund: TU Dortmund).
- Czudnochowski, N., Böskén, C.A., and Geyer, M. (2012). Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. *Nature communications* *3*, 842.
- Damagnez, V., Makela, T.P., and Cottarel, G. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *EMBO J* *14*, 6164-6172.
- Dames, S.A., Schonichen, A., Schulte, A., Barboric, M., Peterlin, B.M., Grzesiek, S., and Geyer, M. (2007). Structure of the Cyclin T binding domain of Hexim1 and molecular basis for its recognition of P-TEFb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 14312-14317.

- de la Mata, M., and Kornblihtt, A.R. (2006). RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat Struct Mol Biol* 13, 973-980.
- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H., and Beaumelle, B. (2012). The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13, 355-363.
- Delmore, J.E., Issa, G.C., Lemieux, M.E., Rahl, P.B., Shi, J., Jacobs, H.M., Kastiris, E., Gilpatrick, T., Paranal, R.M., Qi, J., *et al.* (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146, 904-917.
- Desai, B.M., Villanueva, J., Nguyen, T.T., Lioni, M., Xiao, M., Kong, J., Krepler, C., Vultur, A., Flaherty, K.T., Nathanson, K.L., *et al.* (2013). The anti-melanoma activity of dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signaling. *PloS one* 8, e59588.
- Devaiah, B.N., Lewis, B.A., Cherman, N., Hewitt, M.C., Albrecht, B.K., Robey, P.G., Ozato, K., Sims, R.J., 3rd, and Singer, D.S. (2012). BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II carboxy-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Devault, A., Martinez, A.M., Fesquet, D., Labbe, J.C., Morin, N., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Cavadore, J.C., and Doree, M. (1995). MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *EMBO J* 14, 5027-5036.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8758-8763.
- Dubois, M.F., Bellier, S., Seo, S.J., and Bensaude, O. (1994). Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during heat shock and inhibition of transcription in HeLa cells. *Journal of cellular physiology* 158, 417-426.
- Dundr, M., and Misteli, T. (2010). Biogenesis of nuclear bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000711.
- Duyster, J., Baskaran, R., and Wang, J.Y. (1995). Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeated domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1555-1559.
- Eberhardy, S.R., and Farnham, P.J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *The Journal of biological chemistry* 276, 48562-48571.
- Eberhardy, S.R., and Farnham, P.J. (2002). Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. *The Journal of biological chemistry* 277, 40156-40162.
- Echalier, A., Endicott, J.A., and Noble, M.E. (2010). Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochimica et biophysica acta* 1804, 511-519.
- Edwards, M.C., Wong, C., and Elledge, S.J. (1998). Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity. *Molecular and cellular biology* 18, 4291-4300.
- Egloff, S., Dienstbier, M., and Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends in genetics : TIG* 28, 333-341.

- Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends in genetics* : TIG 24, 280-288.
- Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.
- Egloff, S., Szczepaniak, S.A., Dienstbier, M., Taylor, A., Knight, S., and Murphy, S. (2010). The integrator complex recognizes a new double mark on the POL II CTD. *The Journal of biological chemistry*.
- Eick, D., and Geyer, M. (2013). The RNA polymerase II carboxy-terminal domain (CTD) code. *Chemical reviews* 113, 8456-8490.
- Eilers, M., and Eisenman, R.N. (2008). Myc's broad reach. *Genes & development* 22, 2755-2766.
- Endicott, J.A., Noble, M.E., and Johnson, L.N. (2012). The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annu Rev Biochem* 81, 587-613.
- Estable, M.C., Naghavi, M.H., Kato, H., Xiao, H., Qin, J., Vahlne, A., and Roeder, R.G. (2002). MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. *Journal of biomedical science* 9, 234-245.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews Genetics* 12, 861-874.
- Even, Y., Durieux, S., Escande, M.L., Lozano, J.C., Peaucellier, G., Weil, D., and Genevriere, A.M. (2006). CDC2L5, a Cdk-like kinase with RS domain, interacts with the ASF/SF2-associated protein p32 and affects splicing in vivo. *Journal of cellular biochemistry* 99, 890-904.
- Faiola, F., Liu, X., Lo, S., Pan, S., Zhang, K., Lyman, E., Farina, A., and Martinez, E. (2005). Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol* 25, 10220-10234.
- Feldmann, G., Mishra, A., Bisht, S., Karikari, C., Garrido-Laguna, I., Rasheed, Z., Ottenhof, N.A., Dadon, T., Alvarez, H., Fendrich, V., *et al.* (2011). Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer biology & therapy* 12, 598-609.
- Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2012). The bromodomain interaction module. *FEBS letters* 586, 2692-2704.
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Felletar, I., *et al.* (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067-1073.
- Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* 216, 121-132.
- Fisher, H.F., and Singh, N. (1995). Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods in enzymology* 259, 194-221.
- Fisher, R.P., and Morgan, D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.
- Fraldi, A., Varrone, F., Napolitano, G., Michels, A.A., Majello, B., Bensaude, O., and Lania, L. (2005). Inhibition of Tat activity by the HEXIM1 protein. *Retrovirology* 2, 42.

- Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 4, 575-580.
- Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* 15, 2069-2082.
- French, C.A., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Grier, H.E., Perez-Atayde, A.R., and Fletcher, J.A. (2003). BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer research* 63, 304-307.
- Friedman-Kien, A.E. (1981). Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *Journal of the American Academy of Dermatology* 5, 468-471.
- Fu, W., Sharma, S.S., Ma, L., Chu, B., Bui, M.M., Reed, D., and Pledger, W.J. (2013). Apoptosis of osteosarcoma cultures by the combination of the cyclin-dependent kinase inhibitor SCH727965 and a heat shock protein 90 inhibitor. *Cell death & disease* 4, e566.
- Fu, X.D., and Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343, 437-441.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., and Lis, J.T. (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* 461, 186-192.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B.M. (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Molecular and cellular biology* 24, 787-795.
- Garber, M.E., Wei, P., and Jones, K.A. (1998). HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 63, 371-380.
- Ghamari, A., van de Corput, M.P., Thongjuea, S., van Cappellen, W.A., van Ijcken, W., van Haren, J., Soler, E., Eick, D., Lenhard, B., and Grosveld, F.G. (2013). In vivo live imaging of RNA polymerase II transcription factories in primary cells. *Genes Dev* 27, 767-777.
- Glover-Cutter, K., Larochelle, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R.P., and Bentley, D.L. (2009). TFIIF-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 29, 5455-5464.
- Goldberg, J., Nairn, A.C., and Kuriyan, J. (1996). Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell* 84, 875-887.
- Grana, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P.P., Rosenblatt, J., Morgan, D.O., and Giordano, A. (1994). PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3834-3838.
- Grayson, A.R., Walsh, E.M., Cameron, M.J., Godec, J., Ashworth, T., Ambrose, J.M., Aserlind, A.B., Wang, H., Evan, G.I., Kluk, M.J., *et al.* (2014). MYC, a downstream target of BRD-NUT, is necessary and sufficient for the blockade of differentiation in NUT midline carcinoma. *Oncogene* 33, 1736-1742.

- Grunberg, S., Warfield, L., and Hahn, S. (2012). Architecture of the RNA polymerase II preinitiation complex and mechanism of ATP-dependent promoter opening. *Nat Struct Mol Biol* 19, 788-796.
- Gu, B., Eick, D., and Bensaude, O. (2013). CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II in vivo. *Nucleic Acids Res* 41, 1591-1603.
- Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L., and Amati, B. (2006). Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 8, 764-770.
- Gui, J.F., Lane, W.S., and Fu, X.D. (1994). A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369, 678-682.
- Guo, Z., and Stiller, J.W. (2004). Comparative genomics of cyclin-dependent kinases suggest co-evolution of the RNAP II C-terminal domain and CTD-directed CDKs. *BMC Genomics* 5, 69.
- Guo, Z., and Stiller, J.W. (2005). Comparative genomics and evolution of proteins associated with RNA polymerase II C-terminal domain. *Mol Biol Evol* 22, 2166-2178.
- Gupta, S., and Davis, R.J. (1994). MAP kinase binds to the NH2-terminal activation domain of c-Myc. *FEBS letters* 353, 281-285.
- Hahntow, I.N., Schneller, F., Oelsner, M., Weick, K., Ringshausen, I., Fend, F., Peschel, C., and Decker, T. (2004). Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 18, 747-755.
- Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z., and Koncz, C. (2012). CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II. *The Plant cell* 24, 1626-1642.
- Hajheidari, M., Koncz, C., and Eick, D. (2013). Emerging roles for RNA polymerase II CTD in Arabidopsis. *Trends in plant science* 18, 633-643.
- Hann, S.R. (2006). Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin Cancer Biol* 16, 288-302.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 12, 357-369.
- Hastie, C.J., McLauchlan, H.J., and Cohen, P. (2006). Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat Protoc* 1, 968-971.
- Hautbergue, G., and Goguel, V. (2001). Activation of the cyclin-dependent kinase CTDK-I requires the heterodimerization of two unstable subunits. *The Journal of biological chemistry* 276, 8005-8013.
- He, N., Chan, C.K., Sobhian, B., Chou, S., Xue, Y., Liu, M., Alber, T., Benkirane, M., and Zhou, Q. (2011). Human Polymerase-Associated Factor complex (PAFc) connects the Super Elongation Complex (SEC) to RNA polymerase II on chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E636-645.
- He, N., Liu, M., Hsu, J., Xue, Y., Chou, S., Burlingame, A., Krogan, N.J., Alber, T., and Zhou, Q. (2010). HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Mol Cell* 38, 428-438.
- Heidemann, M., and Eick, D. (2012). Tyrosine-1 and threonine-4 phosphorylation marks complete the RNA polymerase II CTD phospho-code. *RNA biology* 9, 1144-1146.

- Heidemann, M., Hintermair, C., Voss, K., and Eick, D. (2012). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochimica et biophysica acta*.
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voss, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochimica et biophysica acta* 1829, 55-62.
- Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (1995). Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *Journal of virology* 69, 1612-1620.
- Hintermair, C., Heidemann, M., Koch, F., Descostes, N., Gut, M., Gut, I., Fenouil, R., Ferrier, P., Flatley, A., Kremmer, E., *et al.* (2012). Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *EMBO J* 31, 2784-2797.
- Holt, L.J., Tuch, B.B., Villen, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., and Morgan, D.O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* 325, 1682-1686.
- Hong, S.W., Hong, S.M., Yoo, J.W., Lee, Y.C., Kim, S., Lis, J.T., and Lee, D.K. (2009). Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by TFIIF kinase is not essential for transcription of *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14276-14280.
- Hönig, D. (2013). Biochemische und strukturbiologische Charakterisierung des humanen CDK13/Cyclin K Komplexes. Masterarbeit.
- Hottiger, M.O., and Nabel, G.J. (1998). Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *Journal of virology* 72, 8252-8256.
- Hsin, J.P., Sheth, A., and Manley, J.L. (2011). RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* 334, 683-686.
- Hunter, T., and Plowman, G.D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22, 18-22.
- Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282.
- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *Journal of molecular biology* 290, 929-941.
- Itzen, F., Greifenberg, A.K., Böskén, C.A., and Geyer, M. (2014). Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation. *Nucleic acids research*.
- Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J.R., McGovern, K.E., Clarke, S.C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., *et al.* (2012). Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* 481, 365-370.
- Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.S., Brady, J.N., and Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 19, 523-534.
- Jasnovidova, O., and Stefl, R. (2013). The CTD code of RNA polymerase II: a structural view. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 4, 1-16.

- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.
- Jelesarov, I., and Bosshard, H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of molecular recognition : JMR* 12, 3-18.
- Ji, X., Zhou, Y., Pandit, S., Huang, J., Li, H., Lin, C.Y., Xiao, R., Burge, C.B., and Fu, X.D. (2013). SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase. *Cell* 153, 855-868.
- Jiang, Y.W., Veschambre, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., and Kornberg, R.D. (1998). Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8538-8543.
- Jimenez-Garcia, L.F., and Spector, D.L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
- Johnson, A.J., Yeh, Y.Y., Smith, L.L., Wagner, A.J., Hessler, J., Gupta, S., Flynn, J., Jones, J., Zhang, X., Bannerji, R., *et al.* (2012). The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 26, 2554-2557.
- Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M., and Wold, B. (2007). Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* 316, 1497-1502.
- Johnson, N., and Shapiro, G.I. (2010). Cyclin-dependent kinases (cdks) and the DNA damage response: rationale for cdk inhibitor-chemotherapy combinations as an anticancer strategy for solid tumors. *Expert opinion on therapeutic targets* 14, 1199-1212.
- Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P.A., Verdin, E., and Ott, M. (2003). Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Molecular cell* 12, 167-176.
- Kaldis, P. (1999). The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55, 284-296.
- Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., *et al.* (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869-873.
- Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T., and Peterlin, B.M. (2003). c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22, 5707-5711.
- Kanin, E.I., Kipp, R.T., Kung, C., Slattery, M., Viale, A., Hahn, S., Shokat, K.M., and Ansari, A.Z. (2007). Chemical inhibition of the TFIIH-associated kinase Cdk7/Kin28 does not impair global mRNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5812-5817.
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E., and Hart, G.W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *The Journal of biological chemistry* 268, 10416-10424.
- Keren, A., Tamir, Y., and Bengal, E. (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and cellular endocrinology* 252, 224-230.

- Kettenberger, H., Armache, K.J., and Cramer, P. (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Molecular cell* 16, 955-965.
- Khokhlatchev, A., Xu, S., English, J., Wu, P., Schaefer, E., and Cobb, M.H. (1997). Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 272, 11057-11062.
- Kiernan, R.E., Emiliani, S., Nakayama, K., Castro, A., Labbe, J.C., Lorca, T., Nakayama Ki, K., and Benkirane, M. (2001). Interaction between cyclin T1 and SCF(SKP2) targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome. *Molecular and cellular biology* 21, 7956-7970.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., *et al.* (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J* 18, 6106-6118.
- Kim, E., Du, L., Bregman, D.B., and Warren, S.L. (1997). Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *The Journal of cell biology* 136, 19-28.
- Kim, H., Erickson, B., Luo, W., Seward, D., Graber, J.H., Pollock, D.D., Megee, P.C., and Bentley, D.L. (2010). Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code. *Nat Struct Mol Biol*.
- Kim, H.J., Jeong, S.H., Heo, J.H., Jeong, S.J., Kim, S.T., Youn, H.D., Han, J.W., Lee, H.W., and Cho, E.J. (2004). mRNA capping enzyme activity is coupled to an early transcription elongation. *Molecular and cellular biology* 24, 6184-6193.
- Kim, J.B., and Sharp, P.A. (2001). Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *The Journal of biological chemistry* 276, 12317-12323.
- Kim, M., Suh, H., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2009). Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7. *The Journal of biological chemistry* 284, 26421-26426.
- Kim, T.K., Ebright, R.H., and Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH. *Science* 288, 1418-1422.
- Kipreos, E.T., and Wang, J.Y. (1992). Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 256, 382-385.
- Ko, T.K., Kelly, E., and Pines, J. (2001). CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *Journal of cell science* 114, 2591-2603.
- Kohoutek, J., and Blazek, D. (2012). Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13. *Cell division* 7, 12.
- Kornberg, R.D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30, 235-239.
- Krueger, B.J., Varzavand, K., Cooper, J.J., and Price, D.H. (2010). The mechanism of release of P-TEFb and HEXIM1 from the 7SK snRNP by viral and cellular activators includes a conformational change in 7SK. *PLoS one* 5, e12335.
- Krystof, V., Baumli, S., and Furst, R. (2012). Perspective of cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a drug target. *Curr Pharm Des* 18, 2883-2890.
- Krystof, V., Chamrad, I., Jorda, R., and Kohoutek, J. (2010). Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy. *Med Res Rev* 30, 646-666.

- Labbe, J.C., Martinez, A.M., Fesquet, D., Capony, J.P., Darbon, J.M., Derancourt, J., Devault, A., Morin, N., Cavadore, J.C., and Doree, M. (1994). p40MO15 associates with a p36 subunit and requires both nuclear translocation and Thr176 phosphorylation to generate cdk-activating kinase activity in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 13, 5155-5164.
- Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 605-612.
- Larochelle, S., Amat, R., Glover-Cutter, K., Sanso, M., Zhang, C., Allen, J.J., Shokat, K.M., Bentley, D.L., and Fisher, R.P. (2012). Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1108-1115.
- Lebars, I., Martinez-Zapien, D., Durand, A., Coutant, J., Kieffer, B., and Dock-Bregeon, A.C. (2010). HEXIM1 targets a repeated GAUC motif in the riboregulator of transcription 7SK and promotes base pair rearrangements. *Nucleic acids research* 38, 7749-7763.
- Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell* 152, 1237-1251.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.
- Li, Q., Price, J.P., Byers, S.A., Cheng, D., Peng, J., and Price, D.H. (2005). Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *The Journal of biological chemistry* 280, 28819-28826.
- Liao, S.M., Zhang, J., Jeffery, D.A., Koleske, A.J., Thompson, C.M., Chao, D.M., Viljoen, M., van Vuuren, H.J., and Young, R.A. (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 374, 193-196.
- Lin, C., Smith, E.R., Takahashi, H., Lai, K.C., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., and Shilatifard, A. (2010). AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Molecular cell* 37, 429-437.
- Lin, C.Y., Loven, J., Rahl, P.B., Paranal, R.M., Burge, C.B., Bradner, J.E., Lee, T.I., and Young, R.A. (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151, 56-67.
- Lin, J., Sun, T., Ji, L., Deng, W., Roth, J., Minna, J., and Arlinghaus, R. (2007). Oncogenic activation of c-Abl in non-small cell lung cancer cells lacking FUS1 expression: inhibition of c-Abl by the tumor suppressor gene product Fus1. *Oncogene* 26, 6989-6996.
- Lin, S., and Fu, X.D. (2007). SR proteins and related factors in alternative splicing. *Advances in experimental medicine and biology* 623, 107-122.
- Liou, Y.C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.X., Huang, H.K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., *et al.* (2003). Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* 424, 556-561.
- Lis, J.T., Mason, P., Peng, J., Price, D.H., and Werner, J. (2000). P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes & development* 14, 792-803.
- Liu, J., and Kipreos, E.T. (2000). Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol Biol Evol* 17, 1061-1074.

- Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 18, 211-212.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., and Darnell, J.E. (2003). *Molecular Cell Biology*, 5th edn (New York: W.H.Freeman & Co Ltd).
- Lolli, G. (2009). Binding to DNA of the RNA-polymerase II C-terminal domain allows discrimination between Cdk7 and Cdk9 phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 37, 1260-1268.
- Lottspeich, F. (2008). Separation sciences in the era of proteomics. *Electrophoresis* 29, 2449-2450.
- Lowe, E.D., Tews, I., Cheng, K.Y., Brown, N.R., Gul, S., Noble, M.E., Gamblin, S.J., and Johnson, L.N. (2002). Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A. *Biochemistry* 41, 15625-15634.
- Lu, H., Li, Z., Xue, Y., and Zhou, Q. (2013). Viral-host interactions that control HIV-1 transcriptional elongation. *Chemical reviews* 113, 8567-8582.
- Lu, K.P., Finn, G., Lee, T.H., and Nicholson, L.K. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature chemical biology* 3, 619-629.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., Flaus, A.J., Wayne, M.M., and Richmond, T.J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *Journal of molecular biology* 272, 301-311.
- Luo, Z., Lin, C., and Shilatifard, A. (2012). The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 543-547.
- Luscher, B., and Larsson, L.G. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* 18, 2955-2966.
- Madhusudan, Akamine, P., Xuong, N.H., and Taylor, S.S. (2002). Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nature structural biology* 9, 273-277.
- Makela, T.P., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J., and Weinberg, R.A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* 371, 254-257.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.H., and Wolgemuth, D.J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 11, 1275-1276.
- Mancebo, H.S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., *et al.* (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes & development* 11, 2633-2644.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., Blandino, G., and Del Sal, G. (2004). Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell* 14, 625-636.
- Mantovani, F., Tocco, F., Girardini, J., Smith, P., Gasco, M., Lu, X., Crook, T., and Del Sal, G. (2007). The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nat Struct Mol Biol* 14, 912-920.

- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D.H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *The Journal of biological chemistry* *271*, 27176-27183.
- Marshall, N.F., and Price, D.H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *The Journal of biological chemistry* *270*, 12335-12338.
- Martin, M.P., Olesen, S.H., Georg, G.I., and Schonbrunn, E. (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib interacts with the acetyl-lysine recognition site of bromodomains. *ACS chemical biology* *8*, 2360-2365.
- Mayer, A., Heidemann, M., Lidschreiber, M., Schrieck, A., Sun, M., Hintermair, C., Kremmer, E., Eick, D., and Cramer, P. (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science* *336*, 1723-1725.
- Mayer, A., Lidschreiber, M., Siebert, M., Leike, K., Soding, J., and Cramer, P. (2010). Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat Struct Mol Biol*.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., and Bentley, D.L. (1997). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development* *11*, 3306-3318.
- McMillin, D.W., Delmore, J., Negri, J., Buon, L., Jacobs, H.M., Laubach, J., Jakubikova, J., Ooi, M., Hayden, P., Schlossman, R., *et al.* (2011). Molecular and cellular effects of multi-targeted cyclin-dependent kinase inhibition in myeloma: biological and clinical implications. *British journal of haematology* *152*, 420-432.
- Mertz, J.A., Conery, A.R., Bryant, B.M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D.A., Bergeron, L., and Sims, R.J., 3rd (2011). Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 16669-16674.
- Metzger, D., and Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* *10*, 470-476.
- Michels, A.A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T.E., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Sedore, S.C., Price, J.P., Price, D.H., Lania, L., *et al.* (2004). Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J* *23*, 2608-2619.
- Michels, A.A., Nguyen, V.T., Fraldi, A., Labas, V., Edwards, M., Bonnet, F., Lania, L., and Bensaude, O. (2003). MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Molecular and cellular biology* *23*, 4859-4869.
- Misteli, T., Caceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F., and Spector, D.L. (1998). Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *The Journal of cell biology* *143*, 297-307.
- Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, A.J., Jr., and Ashwell, J.D. (2005). Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell cycle* *4*, 1189-1192.
- Monje, P., Hernandez-Losa, J., Lyons, R.J., Castellone, M.D., and Gutkind, J.S. (2005). Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem* *280*, 35081-35084.
- Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* *136*, 688-700.

- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M.P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J.L., *et al.* (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 110, 4445-4454.
- Mueller, D., Garcia-Cuellar, M.P., Bach, C., Buhl, S., Maethner, E., and Slany, R.K. (2009). Misguided transcriptional elongation causes mixed lineage leukemia. *PLoS Biol* 7, e1000249.
- Mujeeb, A., Bishop, K., Peterlin, B.M., Turck, C., Parslow, T.G., and James, T.L. (1994). NMR structure of a biologically active peptide containing the RNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 Tat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8248-8252.
- Müller, D., Rouleau, E., Schultz, I., Caputo, S., Lefol, C., Bieche, I., Caron, O., Nogues, C., Limacher, J.M., Demange, L., *et al.* (2011). An entire exon 3 germ-line rearrangement in the BRCA2 gene: pathogenic relevance of exon 3 deletion in breast cancer predisposition. *BMC medical genetics* 12, 121.
- Müller, M.M., Gerster, T., and Schaffner, W. (1988). Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *European journal of biochemistry / FEBS* 176, 485-495.
- Munoz, M.J., Perez Santangelo, M.S., Paronetto, M.P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J.J., *et al.* (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* 137, 708-720.
- Murphy, C.I., and Piwnica-Worms, H. (2001). Overview of the baculovirus expression system. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5*, Unit5 4.
- Murphy, C.I., Piwnica-Worms, H., Grunwald, S., Romanow, W.G., Francis, N., and Fan, H.Y. (2004). Overview of the baculovirus expression system. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 16*, Unit 16 19.
- Nawrath, C., Schell, J., and Koncz, C. (1990). Homologous domains of the largest subunit of eucaryotic RNA polymerase II are conserved in plants. *Molecular & general genetics : MGG* 223, 65-75.
- Nechaev, S., and Adelman, K. (2011). Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochimica et biophysica acta* 1809, 34-45.
- Nguyen, T.K., and Grant, S. (2014). Dinaciclib (SCH727965) inhibits the unfolded protein response through a CDK1- and 5-dependent mechanism. *Molecular cancer therapeutics* 13, 662-674.
- Ni, Z., Schwartz, B.E., Werner, J., Suarez, J.R., and Lis, J.T. (2004). Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Molecular cell* 13, 55-65.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K.L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C.W., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., *et al.* (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468, 1119-1123.

- Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., *et al.* (2012). c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 151, 68-79.
- Noble, M.E., Endicott, J.A., Brown, N.R., and Johnson, L.N. (1997). The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem Sci* 22, 482-487.
- Noguchi, K., Kitanaka, C., Yamana, H., Kokubu, A., Mochizuki, T., and Kuchino, Y. (1999). Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 32580-32587.
- Noguchi, K., Kokubu, A., Kitanaka, C., Ichijo, H., and Kuchino, Y. (2001). ASK1-signaling promotes c-Myc protein stability during apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 281, 1313-1320.
- O'Keefe, R.T., Mayeda, A., Sadowski, C.L., Krainer, A.R., and Spector, D.L. (1994). Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *The Journal of cell biology* 124, 249-260.
- Orlando, V., and Paro, R. (1993). Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75, 1187-1198.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & development* 10, 2657-2683.
- Ott, M., Geyer, M., and Zhou, Q. (2011). The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell host & microbe* 10, 426-435.
- Ott, M., Schnolzer, M., Garnica, J., Fischle, W., Emiliani, S., Rackwitz, H.R., and Verdin, E. (1999). Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Current biology : CB* 9, 1489-1492.
- Palancade, B., and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *European journal of biochemistry / FEBS* 270, 3859-3870.
- Pandit, S., Wang, D., and Fu, X.D. (2008). Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries. *Curr Opin Cell Biol* 20, 260-265.
- Parry, D., Guzi, T., Shanahan, F., Davis, N., Prabhavalkar, D., Wiswell, D., Seghezzi, W., Paruch, K., Dwyer, M.P., Doll, R., *et al.* (2010). Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* 9, 2344-2353.
- Paruch, K., Dwyer, M.P., Alvarez, C., Brown, C., Chan, T.Y., Doll, R.J., Keertikar, K., Knutson, C., McKittrick, B., Rivera, J., *et al.* (2010). Discovery of Dinaciclib (SCH 727965): A Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases. *ACS medicinal chemistry letters* 1, 204-208.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular biology* 287, 821-828.
- Peng, J., Marshall, N.F., and Price, D.H. (1998). Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *The Journal of biological chemistry* 273, 13855-13860.
- Perales, R., and Bentley, D. (2009). "Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Molecular cell* 36, 178-191.
- Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular cell* 23, 297-305.

- Petersen-Mahrt, S.K., Estmer, C., Ohrmalm, C., Matthews, D.A., Russell, W.C., and Akusjarvi, G. (1999). The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J* 18, 1014-1024.
- Peterson, C.L., Kruger, W., and Herskowitz, I. (1991). A functional interaction between the C-terminal domain of RNA polymerase II and the negative regulator SIN1. *Cell* 64, 1135-1143.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.
- Pinhero, R., Liaw, P., Bertens, K., and Yankulov, K. (2004). Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 1004-1014.
- Prasanth, K.V., Camiolo, M., Chan, G., Tripathi, V., Denis, L., Nakamura, T., Hubner, M.R., and Spector, D.L. (2010). Nuclear organization and dynamics of 7SK RNA in regulating gene expression. *Molecular biology of the cell* 21, 4184-4196.
- Quereda, V., and Malumbres, M. (2009). Cell cycle control of pituitary development and disease. *Journal of molecular endocrinology* 42, 75-86.
- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141, 432-445.
- Ramanathan, Y., Rajpara, S.M., Reza, S.M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M.B., and Pe'ery, T. (2001). Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *The Journal of biological chemistry* 276, 10913-10920.
- Ranuncolo, S.M., Ghosh, S., Hanover, J.A., Hart, G.W., and Lewis, B.A. (2012). Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 287, 23549-23561.
- Rasmussen, E.B., and Lis, J.T. (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7923-7927.
- Renner, D.B., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., and Price, D.H. (2001). A highly purified RNA polymerase II elongation control system. *J Biol Chem* 276, 42601-42609.
- Riggs, N.L., Little, S.J., Richman, D.D., and Guatelli, J.C. (1994). Biological importance and cooperativity of HIV-1 regulatory gene splice acceptors. *Virology* 202, 264-271.
- Rodriguez, R.M., Huidobro, C., Urdinguio, R.G., Mangas, C., Soldevilla, B., Dominguez, G., Bonilla, F., Fernandez, A.F., and Fraga, M.F. (2012). Aberrant epigenetic regulation of bromodomain BRD4 in human colon cancer. *Journal of molecular medicine* 90, 587-595.
- Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-335.
- Rosonina, E., and Blencowe, B.J. (2004). Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3'-end cleavage. *Rna* 10, 581-589.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1996a). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996b). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature structural biology* 3, 696-700.

- Sainsbury, S., Niesser, J., and Cramer, P. (2013). Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II-TFIIB complex. *Nature* 493, 437-440.
- Sakamuro, D., and Prendergast, G.C. (1999). New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* 18, 2942-2954.
- Sanchez-Arevalo Lobo, V.J., Doni, M., Verrecchia, A., Sanulli, S., Faga, G., Piontini, A., Bianchi, M., Conacci-Sorrell, M., Mazzarol, G., Peg, V., *et al.* (2013). Dual regulation of Myc by Abl. *Oncogene*.
- Sanger, F. (1975). The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society 191, 317-333.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74, 5463-5467.
- Sano, M., Abdellatif, M., Oh, H., Xie, M., Bagella, L., Giordano, A., Michael, L.H., DeMayo, F.J., and Schneider, M.D. (2002). Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat Med* 8, 1310-1317.
- Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 557-567.
- Schonichen, A., Bigalke, J.M., Urbanke, C., Grzesiek, S., Dames, S.A., and Geyer, M. (2010). A flexible bipartite coiled coil structure is required for the interaction of Hexim1 with the P-TEFb subunit cyclin T1. *Biochemistry* 49, 3083-3091.
- Schröder, S., Cho, S., Zeng, L., Zhang, Q., Kaehlcke, K., Mak, L., Lau, J., Bisgrove, D., Schnolzer, M., Verdin, E., *et al.* (2012). Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes. *The Journal of biological chemistry* 287, 1090-1099.
- Schröder, S., Herker, E., Itzen, F., He, D., Thomas, S., Gilchrist, D.A., Kaehlcke, K., Cho, S., Pollard, K.S., Capra, J.A., *et al.* (2013). Acetylation of RNA polymerase II regulates growth-factor-induced gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell* 52, 314-324.
- Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes & development* 14, 2435-2440.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schonichen, A., Blazek, D., Peterlin, B.M., and Geyer, M. (2005). Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *The Journal of biological chemistry* 280, 24968-24977.
- Schulze-Gahmen, U., Lu, H., Zhou, Q., and Alber, T. (2014). AFF4 binding to Tat-P-TEFb indirectly stimulates TAR recognition of super elongation complexes at the HIV promoter. *eLife* 3, e02375.
- Schulze-Gahmen, U., Upton, H., Birnberg, A., Bao, K., Chou, S., Krogan, N.J., Zhou, Q., and Alber, T. (2013). The AFF4 scaffold binds human P-TEFb adjacent to HIV Tat. *eLife* 2, e00327.
- Schwartz, B.E., Hofer, M.D., Lemieux, M.E., Bauer, D.E., Cameron, M.J., West, N.H., Agoston, E.S., Reynoird, N., Khochbin, S., Ince, T.A., *et al.* (2011). Differentiation of NUT midline carcinoma by epigenomic reprogramming. *Cancer research* 71, 2686-2696.

- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development* *14*, 2501-2514.
- Serizawa, H., Makela, T.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Weinberg, R.A., and Young, R.A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIID. *Nature* *374*, 280-282.
- Shapiro, G.I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *24*, 1770-1783.
- Shen, H., Kan, J.L., and Green, M.R. (2004). Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Molecular cell* *13*, 367-376.
- Shiekhatar, R., Mermelstein, F., Fisher, R.P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H.C., Morgan, D.O., and Reinberg, D. (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIID. *Nature* *374*, 283-287.
- Shim, E.Y., Walker, A.K., Shi, Y., and Blackwell, T.K. (2002). CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes & development* *16*, 2135-2146.
- Shimotohno, A., Ohno, R., Bisova, K., Sakaguchi, N., Huang, J., Koncz, C., Uchimiya, H., and Umeda, M. (2006). Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *47*, 701-710.
- Shimotohno, A., Umeda-Hara, C., Bisova, K., Uchimiya, H., and Umeda, M. (2004). The plant-specific kinase CDKF1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis. *The Plant cell* *16*, 2954-2966.
- Sikorski, T.W., and Buratowski, S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 344-351.
- Sims, R.J., 3rd, Mandal, S.S., and Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 263-271.
- Singer, R.H., and Green, M.R. (1997). Compartmentalization of eukaryotic gene expression: causes and effects. *Cell* *91*, 291-294.
- Sobhian, B., Laguette, N., Yatim, A., Nakamura, M., Levy, Y., Kiernan, R., and Benkirane, M. (2010). HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Mol Cell* *38*, 439-451.
- Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M.F., Piwnica-Worms, H., and Cantley, L.C. (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Current biology : CB* *4*, 973-982.
- Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L.H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., *et al.* (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* *16*, 6486-6493.

- Spector, D.L., Fu, X.D., and Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* 10, 3467-3481.
- Srinivasan, D., and Plattner, R. (2006). Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells. *Cancer research* 66, 5648-5655.
- Sudol, M., Sliwa, K., and Russo, T. (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS letters* 490, 190-195.
- Sun, X., Zhang, Y., Cho, H., Rickert, P., Lees, E., Lane, W., and Reinberg, D. (1998). NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Molecular cell* 2, 213-222.
- Suzuki, M. (1990). The heptad repeat in the largest subunit of RNA polymerase II binds by intercalating into DNA. *Nature* 344, 562-565.
- Svejstrup, J.Q., Li, Y., Fellows, J., Gnatt, A., Bjorklund, S., and Kornberg, R.D. (1997). Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6075-6078.
- Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C., and Price, D.H. (2010). Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 465, 747-751.
- Takaki, T., Echaliier, A., Brown, N.R., Hunt, T., Endicott, J.A., and Noble, M.E. (2009). The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 4171-4176.
- Takatsuka, H., Ohno, R., and Umeda, M. (2009). The Arabidopsis cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59, 475-487.
- Tassan, J.P., Jaquenoud, M., Fry, A.M., Frutiger, S., Hughes, G.J., and Nigg, E.A. (1995). In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J* 14, 5608-5617.
- Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Rodriguez-Molina, J.B., White, B.E., Akhtar, M.S., Heidemann, M., Li, X., Chapman, R.D., Shokat, K., Keles, S., *et al.* (2010). Chemical-genomic dissection of the CTD code. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1154-1161.
- Tonna, S., El-Osta, A., Cooper, M.E., and Tikellis, C. (2010). Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms. *Nature reviews Nephrology* 6, 332-341.
- Trigon, S., Serizawa, H., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Jackson, S.P., and Morange, M. (1998). Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases. *The Journal of biological chemistry* 273, 6769-6775.
- Umeda, M., Bhalerao, R.P., Schell, J., Uchimiya, H., and Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5021-5026.
- Umeda, M., Shimotohno, A., and Yamaguchi, M. (2005). Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant & cell physiology* 46, 1437-1442.
- Urano, E., Kariya, Y., Futahashi, Y., Ichikawa, R., Hamatake, M., Fukazawa, H., Morikawa, Y., Yoshida, T., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., *et al.* (2008). Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS letters* 582, 4053-4058.

- van der Geer, P., and Hunter, T. (1994). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thin-layer cellulose plates. *Electrophoresis* 15, 544-554.
- Van Herreweghe, E., Egloff, S., Goiffon, I., Jady, B.E., Froment, C., Monsarrat, B., and Kiss, T. (2007). Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb. *EMBO J* 26, 3570-3580.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., *et al.* (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular systems biology* 6, 397.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inze, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 14, 903-916.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., and McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Velazquez-Dones, A., Hagopian, J.C., Ma, C.T., Zhong, X.Y., Zhou, H., Ghosh, G., Fu, X.D., and Adams, J.A. (2005). Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/Sty. *The Journal of biological chemistry* 280, 41761-41768.
- Venetianer, A., Dubois, M.F., Nguyen, V.T., Bellier, S., Seo, S.J., and Bensaude, O. (1995). Phosphorylation state of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) in heat-shocked cells. Possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein (MAP) kinases. *European journal of biochemistry / FEBS* 233, 83-92.
- Verdecia, M.A., Bowman, M.E., Lu, K.P., Hunter, T., and Noel, J.P. (2000). Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nature structural biology* 7, 639-643.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J.M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4, 484-490.
- Viladevall, L., St Amour, C.V., Rosebrock, A., Schneider, S., Zhang, C., Allen, J.J., Shokat, K.M., Schwer, B., Leatherwood, J.K., and Fisher, R.P. (2009). TFIIF and P-TEFb coordinate transcription with capping enzyme recruitment at specific genes in fission yeast. *Molecular cell* 33, 738-751.
- Vollmuth, F., Blankenfeldt, W., and Geyer, M. (2009). Structures of the dual bromodomains of the P-TEFb-activating protein Brd4 at atomic resolution. *The Journal of biological chemistry* 284, 36547-36556.
- Vollmuth, F., and Geyer, M. (2010). Interaction of propionylated and butyrylated histone H3 lysine marks with Brd4 bromodomains. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 6768-6772.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., *et al.* (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & development* 12, 343-356.
- Wallenfang, M.R., and Seydoux, G. (2002). *cdk-7* Is required for mRNA transcription and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5527-5532.

- Wang, J.Y., and McWhirter, J.R. (1994). Tyrosine-kinase-dependent signaling pathways. *Trends in cardiovascular medicine* 4, 264-270.
- Wang, S., and Fischer, P.M. (2008). Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol Sci* 29, 302-313.
- Wang, W., Carey, M., and Gralla, J.D. (1992). Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* 255, 450-453.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92, 451-462.
- Wei, X., Walia, V., Lin, J.C., Teer, J.K., Prickett, T.D., Gartner, J., Davis, S., Stemke-Hale, K., Davies, M.A., Gershenwald, J.E., *et al.* (2011). Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 43, 442-446.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
- Wimmer, J., Fujinaga, K., Taube, R., Cujec, T.P., Zhu, Y., Peng, J., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (1999). Interactions between Tat and TAR and human immunodeficiency virus replication are facilitated by human cyclin T1 but not cyclins T2a or T2b. *Virology* 255, 182-189.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 179, 131-137.
- Wittmann, B.M., Fujinaga, K., Deng, H., Ogba, N., and Montano, M.M. (2005). The breast cell growth inhibitor, estrogen down regulated gene 1, modulates a novel functional interaction between estrogen receptor alpha and transcriptional elongation factor cyclin T1. *Oncogene* 24, 5576-5588.
- Wittmann, B.M., Wang, N., and Montano, M.M. (2003). Identification of a novel inhibitor of breast cell growth that is down-regulated by estrogens and decreased in breast tumors. *Cancer research* 63, 5151-5158.
- Wu, S.Y., Lee, A.Y., Lai, H.T., Zhang, H., and Chiang, C.M. (2013). Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting. *Mol Cell* 49, 843-857.
- Wulf, G., Finn, G., Suizu, F., and Lu, K.P. (2005). Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol* 7, 435-441.
- Xiong, Y.S., Yu, J., Li, C., Zhu, L., Wu, L.J., and Zhong, R.Q. (2013). The role of Siglec-1 and SR-BI interaction in the phagocytosis of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *PLoS one* 8, e58831.
- Xu, Y.X., and Manley, J.L. (2004). Pinning down transcription: regulation of RNA polymerase II activity during the cell cycle. *Cell Cycle* 3, 432-435.
- Xu, Y.X., and Manley, J.L. (2007). Pin1 modulates RNA polymerase II activity during the transcription cycle. *Genes Dev* 21, 2950-2962.
- Xue, Y., Yang, Z., Chen, R., and Zhou, Q. (2010). A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic Acids Res* 38, 360-369.

- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Molecular cell* *21*, 227-237.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* *97*, 41-51.
- Yang, Z., Yik, J.H., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* *19*, 535-545.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., *et al.* (2004). A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* *6*, 308-318.
- Yik, J.H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J.L., Link, A.J., and Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Molecular cell* *12*, 971-982.
- Yik, J.H., Chen, R., Pezda, A.C., Samford, C.S., and Zhou, Q. (2004). A human immunodeficiency virus type 1 Tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for HEXIM1 to inhibit RNA polymerase II transcription through 7SK snRNA-mediated inactivation of P-TEFb. *Molecular and cellular biology* *24*, 5094-5105.
- Yokoyama, A., Lin, M., Naresh, A., Kitabayashi, I., and Cleary, M.L. (2010). A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer cell* *17*, 198-212.
- Zeng, L., Li, J., Muller, M., Yan, S., Mujtaba, S., Pan, C., Wang, Z., and Zhou, M.M. (2005). Selective small molecules blocking HIV-1 Tat and coactivator PCAF association. *J Am Chem Soc* *127*, 2376-2377.
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* *367*, 704-711.
- Zhang, J., Tamilarasu, N., Hwang, S., Garber, M.E., Huq, I., Jones, K.A., and Rana, T.M. (2000). HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *The Journal of biological chemistry* *275*, 34314-34319.
- Zhong, X.Y., Wang, P., Han, J., Rosenfeld, M.G., and Fu, X.D. (2009). SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Molecular cell* *35*, 1-10.
- Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Eldakak, A., Rubinstein, B., and Li, R. (2011). Motility and segregation of Hsp104-associated protein aggregates in budding yeast. *Cell* *147*, 1186-1196.
- Zhou, M., Halanski, M.A., Radonovich, M.F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D.H., and Brady, J.N. (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Molecular and cellular biology* *20*, 5077-5086.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B., and Price, D.H. (1997a). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* *11*, 2622-2632.

-
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B., and Price, D.H. (1997b). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro. *Genes & development* *11*, 2622-2632.
- Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A.R., Herrmann, H., Sison, E.A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., *et al.* (2011). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* *478*, 524-528.

Danksagung

Diese Stelle möchte ich nutzen, um allen Mitwirkenden an meiner Doktorarbeit größten Dank auszusprechen:

- PD Dr. Matthias Geyer für das faszinierendes Projekt und eine hervorragende Betreuung während dieser Dissertation sowie fachliche und sympathische Unterstützung meiner Ausbildung und Doktorarbeit
- Prof. Dr. Engelhard für die freundliche Übernahme des Erstgutachters und die Unterstützung während meines Studiums
- Prof. Dr. Winter für die Übernahme des Zweitgutachtens
- Prof. Dr. Roger Goody für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI
- Prof. Dr. Benjamin U. Kaupp für die Aufnahme in seine Abteilung am caesar
- Sasche Gentz und Karin Vogel-Bachmayr für hilfreiche Tips und technische Unterstützung
- Dr. Christian Böskens und Dr. Friederike Itzen für die vorangegangenen Arbeiten, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre
- allen aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen für die angenehme Zusammenarbeit, Diskussions- und Hilfsbereitschaft und tolle Arbeitsatmosphäre
- Prof. Dr. Dirk Eick (Helmholtz Zentrum, München), Prof. Dr. Kevan Shokat (Universität Californien, San Francisco), Dr. Dalibor Blazek (Masaryk Universität in Brno, Tschechien), Geoffrey Shapiro und Shawn Johnson (Dana-Farber Cancer Institut, Boston) für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Proteinen und compounds
- der Abteilung III des Max-Planck-Instituts in Dortmund, der AG Famulok und AG Halle des caesar Instituts für Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Fragen
- der Fakultät für Chemie und chemische Biologie für die Möglichkeit der Promotion an der Technischen Universität Dortmund
- meinen Kommilitonen, Ruderkameraden und Freunden für Abwechslung außerhalb der Arbeit
- meinen Eltern für moralische Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums
- meiner Schwester und meinem Schwager, die immer für mich da sind
- Tom für seine Gelassenheit und Unterstützung

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Roger S. Goody und am center of advanced european studies and reasearch (caesar) in Bonn in der Arbeitsgruppe Physikalische Biochemie unter der Leitung von PD Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Die selbstständige und eigenhändige Anfertigung dieser Dissertation versichere ich an Eides satt. Alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfen wurden in der Dissertation vermerkt.

Diese Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt.

Dortmund, den 17. September 2014

Ann Katrin Greifenberg