

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.