



**Untersuchungen zur Rolle der Cyclin-abhängigen Kinasen
bei der NF- κ B-vermittelten *de novo* Proteinsynthese und
der Sekretion inflammatorischer Mediatoren**

*The role of CDK-NF- κ B crosstalk in shaping de novo protein
synthesis and secretion of inflammatory mediators*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium (Dr.rer.nat)

Vorgelegt von

Jasmin Priester

Gießen, 2023

Angefertigt am
Fachbereich 08-Biologie und Chemie
in Zusammenarbeit mit dem
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht am: 20.09.2023

verteidigt am: 27.11.2023

eingereicht von: **Jasmin Priester**

Gutachter: Prof. Dr. Sandra Hake
Institut für Genetik
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Die inflammatorischen Zytokine	5
1.2 Interleukin-1 (IL-1)	5
1.3 Der IL-1 vermittelte Signalweg	6
1.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	8
1.5 Die Rolle von NF- κ B in Tumorerkrankungen	9
1.6 Cyclin-abhängige Kinasen	11
1.6.1 Die Zellzyklus-assoziierten CDKs	11
1.6.2 Die transkriptionellen CDKs	14
1.7 Die Funktionen von CDK12	17
1.8 CDK12/13 als potentielle therapeutische Angriffspunkte und Biomarker	19
1.8.1 Pharmakologische Perturbationsmöglichkeiten von CDK12 und CDK13	21
1.9 Das Sekretom der Zelle im Kontext der Genexpression	22
1.10 Zielsetzung	25
2 Material	27
2.1 Geräte	27
2.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.3 Chemikalien und Lösungsmittel	27
2.4 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien	28
2.5 Enzyme	29
2.6 Inhibitoren	29
2.7 Expressionsvektoren	29
2.8 Oligonukleotide	30
2.8.1 Primer für qPCR	30
2.8.2 Primer zur Genotypisierung und Sanger-Sequenzierung	30
2.8.3 Oligonukleotide für Klonierungen	31
2.8.4 Oligonukleotide für den RNAi-vermittelten <i>knockdown</i>	31
2.9 <i>Taqman Assays on Demand</i>	31
2.10 Antikörper	31
2.10.1 Primärantikörper für Western Blot	31
2.10.2 Sekundärantikörper für Western Blot	32
2.11 Puffer und Lösungen	32
2.11.1 Puffer für Zellyse	32
2.11.2 Puffer für SDS-PAGE, Silberfärbung und Western Blot	33
2.11.3 Puffer für Agarosegelelektrophorese	34
2.11.4 Puffer für ELISA	34
2.11.5 Puffer für die KLICK Reaktion	34
2.12 Medien und Zusätze für Zellkulturen und Bakterienkulturen	35

2.12.1	Medien und Zusätze	35
2.12.2	Antibiotika	36
2.12.3	Rekombinante Proteine	36
2.12.4	Stimulanzen	36
2.13	Zelllinien	36
2.14	Bakterienstämme	36
2.15	Software Programme	37
3	Methoden	38
3.1	Mikrobiologische Methoden	38
3.1.1	Transformation von Bakterien (<i>E.coli</i> Top10 oder XL-1 Blue)	38
3.1.2	Kultivierung von Bakterien	38
3.1.3	Lagerung von Bakteriensuspensionen	38
3.2	Zellbiologische Methoden	38
3.2.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	38
3.2.2	Kultivierung und Aussaat von Zellen	39
3.2.3	Behandlung/Stimulation von Zellen	40
3.2.4	Ernte der Zellen und Zellkulturüberstände	40
3.2.5	Transfektion mittels linearem Polyethylenimin (PEI)	41
3.2.6	Transiente Transfektion mit HiPerfect	41
3.2.7	Generierung und Charakterisierung von monoklonalen Zelllinien	41
3.2.8	Propidium-Iodid Färbung und Durchflusszytometrie	42
3.2.9	Zellviabilitäts-Assay (MTS-Assay)	43
3.2.10	Fluoreszenzmikroskopie	43
3.3	Proteinbiochemische Methoden	44
3.3.1	Zell-Lyse	44
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
3.3.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli	44
3.3.4	Silberfärbung von SDS-Gelen	45
3.3.5	Western Blot (<i>semi-dry</i>)	45
3.3.6	Enzyme linked immuno sorbant assay (ELISA)	46
3.3.7	Sekretomanalyse über den <i>proximity extension assay</i> (PEA)	47
3.3.8	Metabolische Markierung mittels L-HPG und KCLICK Chemie	48
3.3.9	Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	50
3.4	Molekularbiologische Methoden	51
3.4.1	Design von sgRNAs	51
3.4.2	Klonierung von sgRNAs in den pX330 Vektor	51
3.4.3	Bestellung von Donorvektoren mit Homologie-Armen (HA)	53
3.4.4	Klonierung der mAID-(mClover)-Resistenzkassetten aus Addgene-Vektoren in den pUC57-Kan-CDK12-HAs Vektor	53
3.4.5	Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen	55
3.4.6	Aufreinigung von genomischer DNA aus humane Zellen	55
3.4.7	Polymerasenkettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten	55
3.4.8	Agarose-Gelelektrophorese	56
3.4.9	Sanger-Sequenzierung	56

3.4.10	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	56
3.4.11	Reverse Transkription (RT)	56
3.4.12	Quantitative Polymerasenkettenreaktion (qPCR)	57
3.4.13	Sequenzierung der RNA	59
3.5	Bioinformatische Auswertungen	59
3.5.1	Auswertung von Omics-Daten	59
3.5.2	Statistische Auswertung	59
4	Ergebnisse.....	60
4.1	Differentielle Effekte verschiedener CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg	60
4.1.1	Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion in HCT116 Zellen.....	61
4.1.2	Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion in HeLa Zellen.....	66
4.1.3	Differentielle Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in Ovarialkarzinomzellen.....	70
4.1.4	Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Proteinsekretion in Ovarialkarzinomzellen.....	91
4.2	Beeinflussung des NF- κ B Signalwegs durch den PROTAC BSJ-4-116	110
4.2.1	Einfluss des PROTACs BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 induzierte Genexpression in HCT116 und HeLa Zellen	111
4.2.2	Untersuchungen zur Zeit- und Dosisabhängigkeit PROTACs BSJ-4-116.....	115
4.3	Das Auxin-induzierte Degron System zur spezifischen Degradation von CDK12	123
4.3.1	Etablierung des Auxin-induzierten Degron Systems.....	124
4.3.2	Einfluss der spezifischen CDK12 Degradation und der simultanen Depletion von CDK12/13 auf den IL-1 Signalweg	134
4.4	Identifizierung des naszierenden Sekretoms mittels L-HPG Markierung und KLINK Chemie.....	142
4.4.1	Etablierung der L-HPG Markierung und Aufreinigung von naszierenden Proteinen aus Zellextrakten	143
4.4.2	Etablierung der L-HPG Markierung und Aufreinigung von naszierenden Proteinen aus Zellkulturüberständen zur Analyse des naszierenden Sekretoms	145
4.4.3	Systematische Untersuchung des IL-1 induzierten Sekretoms mittels L-HPG Markierung, KLINK Chemie und LC-MS/MS	155
5	Diskussion.....	166
5.1	Die Rolle von Cyclin-abhängigen Kinasen im IL-1 Signalweg	166
5.1.1	Der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol supprimiert die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion.....	167
5.1.2	THZ531 hat einen differentiellen Effekt auf verschiedene IL-1 induzierte Gene	169
5.1.3	<i>On</i> und <i>off target</i> Effekte der zielgerichteten Degradation von CDK12 und CDK13 durch den PROTAC BSJ-4-116.....	175
5.1.4	Einfluss der konditionalen, genetischen Depletion von CDK12	180
5.1.5	Eine vergleichende, zusammenfassende Betrachtung der CDK12/13 Inhibitoren und ihrer Effekte auf den IL-1 Signalweg	181
5.2	Unvoreingenommene Identifizierung des IL-1 induzierten Sekretoms in Anwesenheit von Serum	184
6	Fazit, Limitationen und Ausblick.....	191
7	Literaturverzeichnis	193
8	Anhang.....	I

9	Abkürzungsverzeichnis	VI
10	Abbildungsverzeichnis.....	VIII
11	Eidesstattliche Erklärung	XI

Zusammenfassung

Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) sind Serin/Threonin Proteinkinasen, deren enzymatische Aktivität durch korrespondierende Cycline reguliert wird. Einige CDKs kontrollieren den Fortschritt des Zellzyklus, während andere CDKs über die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA Polymerase II eine entscheidende Rolle bei der Genexpression spielen. Zu Letzteren gehören die Elongations-assoziierten Kinasen CDK12 und CDK13, welche Serin2 der CTD während der transkriptionellen Elongation phosphorylieren. Aufgrund der Beteiligung von CDKs an diesen essentiellen biologischen Prozessen, werden CDK Inhibitoren intensiv als potentielle anti-proliferative und pro-apoptotische Therapeutika für die Behandlung von Tumorerkrankungen evaluiert. Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-1 (IL-1) kontrolliert entzündungsfördernde Reaktionen im Kontext von Infektionen, Gewebsverletzungen und Tumoren. Dabei induziert IL-1 einen Signalweg, welcher in der Phosphorylierungs-abhängigen Degradation von Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B resultiert, welcher daraufhin in den Zellkern transloziert und spezifische Genexpressionsprogramme aktiviert. Viele Zielgene von NF- κ B codieren für Faktoren, welche von der Zelle sezerniert werden und die Entzündungsreaktion weiter fördern oder unterbinden. Die durch IL-1 und NF- κ B regulierten Faktoren tragen zu einem tumorfördernden, inflammatorischen Tumormikromilieu bei. Zu Beginn dieser Arbeit deuteten unveröffentlichte, massenspektrometrische Analysen des Phospho-Proteoms darauf hin, dass einige CDKs (inklusive CDK12 und CDK13) nach erfolgter Stimulation von HeLa Zellen mit IL-1 transient phosphoryliert werden.

Ziel der Arbeit war es daher, das Zusammenspiel zwischen dem IL-1-NF- κ B Signalweg und CDKs in Bezug auf die Genexpression und Proteinsekretion inflammatorischer Mediatoren auf funktioneller Ebene zu entschlüsseln. Die Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche pharmakologische CDK Inhibitoren diverse Phänotypen hervorrufen. Der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol supprimiert die IL-1 induzierte Genexpression und Proteinsekretion weitgehend. Der selektive CDK12/13 Inhibitor THZ531 führt zu einer Suppression der Expression einiger IL-1 Zielgene, während die Expression anderer Zielgene deutlich induziert wird. Grund hierfür könnte die Beeinflussung des negativen Regelkreises des Signalwegs, durch die verlangsamte (Re)-Synthese der NF- κ B Inhibitoren I κ B α und A20, sein. Der PROTAC BSJ-4-116, welcher eine zielgerichtete Degradation von CDK12 und CDK13 induziert, supprimiert zeit- und dosisabhängig die IL-1 vermittelte Aktivierung wichtiger Komponenten des IL-1-NF- κ B Signalwegs sowie die Genexpression und die Proteinsekretion inflammatorischer Mediatoren. Die spezifische Degradation von CDK12 und CDK13 über ein Auxin-induziertes Degron System bzw. über siRNA-vermittelte Depletion beeinflusst den IL-1-NF- κ B Signalweg hingegen kaum. In einem separaten Ansatz wurde in dieser Arbeit zudem eine auf KLIKK Chemie basierte Methode etabliert, die eine unvoreingenommene Analyse des

sekretierten Proteoms in Anwesenheit von Serum zulässt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Serumentzug als auch die IL-1 Stimulation spezifische und unterschiedliche Gruppen von sekretierten Proteinen als Reaktion auf Stress oder Entzündungsreize aktivieren.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass alle drei untersuchten CDK Inhibitoren die Transkriptionselongation (gemessen an der RNA-Pol II CTD-Phosphorylierung), die Proliferation und das Überleben von vier verschiedenen Tumorzelllinien in vergleichbarer Weise unterdrücken, im Einklang mit ihren veröffentlichten Wirkungen auf einige der Hauptmerkmale von malignen Tumoren. Allerdings unterscheiden sich die Inhibitoren stark in ihren Auswirkungen auf die IL-1-NF- κ B vermittelte Genexpression und Proteinsekretion. Diese Wirkungen könnten durch *off target* Effekte (auf andere Kinasen), nicht-kanonische Funktionen der CDKs oder auf eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten zurückzuführen sein. Andererseits deutet der milde Phänotyp des genetischen Ansatzes zur Hemmung von CDK12 und CDK13 darauf hin, dass beide Kinasen hochspezifische Funktionen haben oder durch andere Mitglieder der CDK Familie kompensiert werden können. Diese Daten geben auch Hinweise auf einen nicht-kanonischen, IL-1 regulierten Weg, der durch noch unbekannte Mechanismen die Sekretion von Entzündungsmediatoren trotz Unterdrückung der CDK12/13 Aktivität aufrechterhält.

Abstract

Cyclin-dependent kinases (CDK) are serine/threonine protein kinases, whose catalytic activity is regulated by corresponding cyclins. Some CDKs regulate the progression of the cell cycle, while others play an important role in gene expression by phosphorylating the C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II. The latter include the transcription-associated kinases CDK12 and CDK13, which phosphorylate Ser2 of the CTD during transcriptional elongation. Due to the involvement of CDKs in these essential biological processes, CDK inhibitors are being intensely evaluated as anti-proliferative and pro-apoptotic therapeutics for the treatment of cancer. The pro-inflammatory cytokine Interleukin-1 (IL-1) controls inflammatory processes in the context of infection, tissue injuries and tumors by inducing a signaling pathway that results in a phosphorylation-dependent degradation of inhibitors of the transcription factor NF- κ B, which consequently translocates to the nucleus and activates specific gene expression programs. Several NF- κ B target genes encode for soluble factors that are secreted by the cell and promote or suppress inflammation. Therefore, IL-1 and NF- κ B regulated factors contribute to a tumor-promoting and inflammatory tumor microenvironment. At the beginning of this thesis, unpublished mass-spectrometry analysis of the phospho-proteome indicated that some CDKs (including CDK12 and CDK13) are transiently phosphorylated upon IL-1 stimulation in HeLa cells.

The aim of the study was to unravel the CDK- NF- κ B crosstalk in relation to gene expression and protein secretion of inflammatory mediators at the functional level. The results indicate that various pharmacological CDK inhibitors cause diverse phenotypes. The pan-CDK inhibitor flavopiridol profoundly suppresses the IL-1 driven gene expression and protein secretion. The selective CDK12/13 inhibitor THZ531 induces the expression of some IL-1 target genes, while the expression of other target genes is suppressed. This may result from effects on the negative feedback loop of the NF- κ B signaling pathway, due to a delayed (re)-synthesis of the NF- κ B inhibitors I κ B α and A20. The PROTAC BSJ-4-116, which induces the targeted proteasomal degradation of CDK12 and CDK13, time- and dose-dependently suppresses the IL-1 induced activation of important components of the IL-1-NF- κ B signaling pathways and the gene expression and protein secretion of inflammatory mediators. The specific degradation of CDK12 and CDK13 using an auxin-inducible degron system or siRNA mediated decay only slightly affects the IL-1-NF- κ B signaling pathway. In a separate approach, a CLICK-chemistry based method, that allows an unbiased analysis of the secreted proteome in the presence of serum, was established in this study. First results suggest that both, serum-depletion and IL-1 stimulation activate specific and distinct sets of secreted proteins as a response to stress or inflammatory stimuli.

In summary, these data show that all three CDK inhibitors suppress transcription elongation (as measured by RNA polymerase II CTD phosphorylation), proliferation, and survival of four

different tumor cell lines in a comparable manner, consistent with their published effects on some of the hallmarks of malignant tumors. However, the inhibitors differ greatly in their effects on IL-1-NF- κ B mediated gene expression and secretion. These effects could be explained by off-target effects (on other kinases), noncanonical functions of CDKs, or a combination of these two possibilities. On the other hand, the mild phenotype of the genetic approach suggests that both kinases have highly specific functions or may be compensated by other members of the CDK family. The data in CDK12 degron cells also provide evidence for a noncanonical IL-1 regulated pathway that maintains secretion of inflammatory mediators despite suppression of CDK12/13 activity by unknown mechanisms.

1 Einleitung

1.1 Die inflammatorischen Zytokine

Sobald Immunzellen klassische Krankheitserreger wie beispielsweise Bakterien, Viren oder Parasiten erkennen, tritt eine schnelle Reaktion des angeborenen Immunsystems in Kraft. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) werden von den Zellen des angeborenen Immunsystems über spezifische Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) erkannt. Des Weiteren können endogene Alarmine bzw. Schadens-assoziierte molekulare Muster (DAMPs), welche infolge von zellulären Schäden freigesetzt werden, erkannt werden. Die Erkennung von Pathogenen oder Zellschäden induziert daraufhin die Synthese und die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren (Chen and Nunez, 2010; Kumar et al., 2011; Medzhitov and Janeway, 1997). Zu diesen Entzündungsmediatoren gehören auch die inflammatorischen Zytokine wie beispielsweise Chemokine, Interferone oder Interleukine. Es handelt sich hierbei um kleine, regulatorische Proteine, welche eine essentielle Rolle für die Kommunikation im Immunsystem spielen und die Zellantwort auf Infektionen, Entzündungen oder Trauma steuern. Diese Signalproteine können sowohl autokrin oder parakrin als auch juxtakrin, endokrin oder intrazellulär wirken. Zum einen gibt es die pro-inflammatorischen Zytokine, welche die Entzündungsreaktion fördern und zum anderen sogenannte anti-inflammatorische Zytokine. Diese reduzieren die Entzündungsreaktion und fördern die Heilung. Wurden Zytokine von den Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzt, binden diese an ihre eigenen Rezeptoren und amplifizieren die angeborene Immunantwort oder unterdrücken diese nach erfolgter Bekämpfung der Infektion. Freigesetzte Zytokine sind folglich grundlegende Botenstoffe und Lenker der Entzündungsreaktion (Dinarello, 2000, 2007; Liu et al., 2021a; Schmitz et al., 2011).

1.2 Interleukin-1 (IL-1)

Interleukin-1 (IL-1) ist eines der bedeutsamsten pro-inflammatorischen Zytokine. Es kontrolliert entzündungsfördernde Reaktionen des angeborenen Immunsystems infolge von Infektionen und Gewebsverletzungen. Dabei spielt es sowohl bei lokalen als auch bei systemischen Entzündungsantworten eine wichtige Rolle. IL-1 steuert die Transkription, die mRNA Stabilisierung, die Proteinsynthese und die unmittelbare Freisetzung weiterer Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren in dem entzündeten Gewebe. Die Expression mehrerer hundert Zielgene wird durch IL-1 in verschiedenen Zelltypen induziert. Dazu gehören unter anderem *IL-6*, *IL-8*, *CXCL2*, *MCP-1* und *COX-2* (Dinarello, 2009; Garlanda et al., 2013; Weber et al., 2010). Es gibt zwei Formen von Interleukin-1: IL-1 α und IL-1 β . Beide Interleukine binden hochaffin an denselben Rezeptor, obwohl die codierenden Gene nur eine Sequenzhomologie von 30 % aufweisen (Boraschi et al., 2018; Dinarello, 1997; Dower et al., 1986; Kaneko et al., 2019; March et al., 1985).

Aufgrund der bedeutsamen Funktion von IL-1 in der Entzündungsreaktion, spielt die überschüssige Expression beispielsweise eine entscheidende Rolle in einigen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoide Arthritis und Diabetes Typ I. Darüber hinaus kann das IL-1 System pharmakologisch beeinflusst werden. Ein IL-1 Rezeptor-Antagonist (Anakinra) wird beispielsweise für die Behandlung von rheumatoider Arthritis eingesetzt. Auch ein IL-1 β -Antikörper (Canakinumab) und ein rekombinanter IL-1 Rezeptor (Rilonacept) haben ihren Weg in die Kliniken für die Behandlung von auto-inflammatorischen Krankheiten bereits gefunden (Dinarello et al., 2012; Kaneko et al., 2019; Mantovani et al., 2019; Pretre et al., 2022).

Neben der Regulation der akuten und chronischen Entzündung spielt IL-1 zudem eine entscheidende Rolle bei der Reprogrammierung des Tumormikromilieus (Galdiero et al., 2018; Mantovani et al., 2018). IL-1 wird in das Tumormikromilieu sekretiert und fördert dort beispielsweise die Tumorgenese, die Invasivität, die Angiogenese, die Metastasierung und die Immunsuppression (Apte and Voronov, 2017; Briukhovetska et al., 2021; Diep et al., 2022; Gottschlich et al., 2021; Mansouri et al., 2022).

1.3 Der IL-1 vermittelte Signalweg

IL-1 α und IL-1 β binden an denselben Rezeptor und induzieren Signalkaskaden, welche zur Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B und AP-1) führen. Dies führt wiederum zur Expression vieler IL-1 Zielgene (Kaneko et al., 2019; Weber et al., 2010).

In einem ersten Schritt bindet IL-1 an den extrazellulären Bereich des spezifischen IL-1 Rezeptors Typ I (IL-1R1). Dadurch kommt es zu einer Liganden-induzierten Konformationsänderung in der ersten Domäne des extrazellulären Rezeptors, welche die Rekrutierung des IL-1 Rezeptor-akzessorischen Proteins (IL-1R3, früher IL-1RacP) ermöglicht (Boraschi et al., 2018; Casadio et al., 2001). IL-1RacP ist dabei essentiell für die Aktivierung der IL-1 vermittelten Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktion (Wesche et al., 1997). Durch die IL-1 vermittelte Heterodimerisierung der Rezeptoren werden die intrazellulären Domänen in räumliche Nähe gebracht. Es handelt sich um sogenannte TIR-Domänen, welche sowohl im Toll-like-Rezeptor als auch im Interleukin-1-Rezeptor vorkommen. Der myeloische Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) und die Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 4 (IRAK4) lagern sich an die dimerisierten TIR-Domänen an (Brikos et al., 2007; Kaneko et al., 2019). Beide Proteine sind kritische Komponenten des Signalwegs (Adachi et al., 1998; Suzuki et al., 2002). Nach der Autophosphorylierung von IRAK4 und der IRAK4-katalysierten Phosphorylierung von IRAK1 und IRAK2, interagiert der IRAK-Komplex mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6). Es kommt zu einer Oligomerisierung von TRAF6 und dessen E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität wird induziert (Baud et al., 1998). TRAF6 verknüpft Ubiquitin über Lysin-63 (K63) zu sogenannten nicht-degradativen Polyubiquitinketten an

mehreren Komponenten des IL-1 Signalwegs. Dabei kommt es unter anderem zur Polyubiquitinierung der MAP3-Kinase *TGF- β -activated protein kinase kinase kinase* (TAK1), welche sich in einem Komplex mit den Adaptormolekülen TAB1 und TAB2 befindet (Deng et al., 2000; Weber et al., 2010). TAK1 phosphoryliert nach dessen Aktivierung den I κ B-Kinase (IKK) Komplex bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ /NEMO (Rebe and Ghiringhelli, 2020; Rothwarf et al., 1998; Wang et al., 2001; Zandi et al., 1997). Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert wiederum das inhibitorische κ B-Protein (I κ B α). Die Phosphorylierung von I κ B α hat schließlich dessen Polyubiquitinierung und den proteasomalen Abbau zur Folge (Abb. 1.1). I κ B α bindet an das NF- κ B Dimer, bestehend aus p65 und p50, und sorgt für deren zytoplasmatische Retention. Die IL-1 induzierte Degradation von I κ B α ermöglicht somit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors, welcher daraufhin in den Zellkern transloziert und die pro-inflammatorische Genexpression induziert (Bacher et al., 2021; Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

Mehrere hundert IL-1 Zielgene werden über NF- κ B induziert. Eines dieser Gene ist *NF κ BIA*, welches für I κ B α codiert. Nach erfolgter Re-Synthese von I κ B α geht dieses in den Zellkern, verdrängt NF- κ B kompetitiv von Promotoren und sorgt für den Rücktransport des Transkriptionsfaktors in das Zytoplasma (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Zudem wird die Expression von *TNFAIP3* induziert. Dieses Gen codiert für die Deubiquitinase A20, welche den IKK Komplex negativ reguliert und somit den NF- κ B Signalweg unterbindet. IL-1 induziert somit einen negativen Regelkreislauf, welcher die Signaltransduktion kontrolliert und deaktiviert (Meier-Soelch et al., 2021; Shembade and Harhaj, 2012).

Des Weiteren induziert IL-1 die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren (Abb.1.1). Der aktivierte TAK1-Komplex phosphoryliert und aktiviert mehrere Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MKKs). Dies führt wiederum zur Phosphorylierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und p38. Diese Kinasen phosphorylieren im Anschluss beispielsweise das *activator protein-1* (AP-1). Hierbei handelt es sich um einen weiteren (hetero)dimeren Transkriptionsfaktor, der nach erfolgter Aktivierung in den Zellkern transloziert und die Genexpression vieler IL-1 Zielgene koordiniert. Die Expression inflammatorischer Gene wird kooperativ über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert. Unter den IL-1 Zielgenen befinden sich viele Chemokine, welche nach erfolgter Synthese von der Zelle in den extrazellulären Raum sekretiert werden (Dinarello, 2000; Holtmann et al., 2001; Kyriakis and Avruch, 2012; Rebe and Ghiringhelli, 2020).

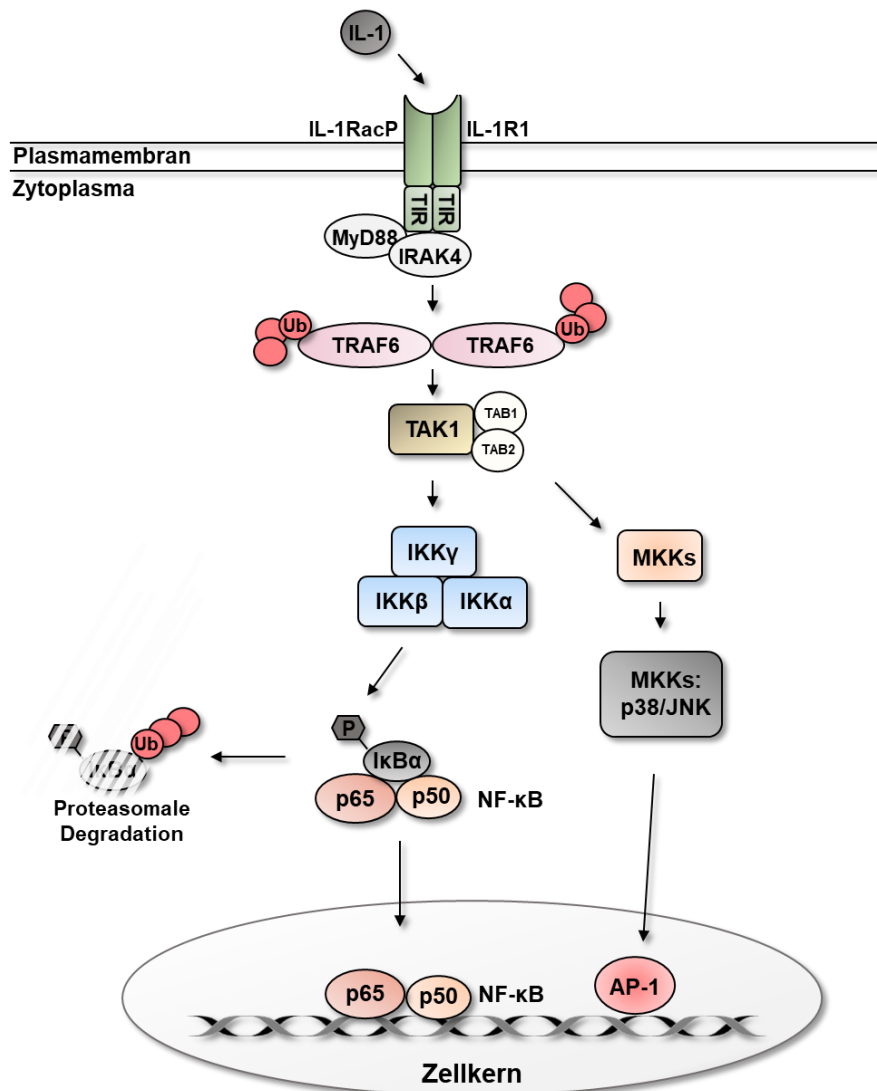


Abb. 1.1 Der IL-1 vermittelte Signalweg.

IL-1α oder IL-1β binden an den IL-1 Rezeptor (IL-1R1). Dieser erfährt eine extrazelluläre Konformationsänderung und dimerisiert mit dem IL-1R akzessorischen Protein (IL-1RacP). Die intrazellulären TIR-Domänen der Rezeptoren werden in räumliche Nähe gebracht, was die Anlagerung von MyD88 und IRAK4 ermöglicht. IRAK4 vermittelt wiederum die Dimerisierung und (Auto)Polyubiquitinierung von TRAF6. Nicht-degradative Polyubiquitinketten werden sodann auf TAK1 übertragen, welche sich in einem Komplex mit TAB1 und TAB2 befindet. TAK1 aktiviert wiederum den IKK-Komplex bestehend aus IKKα, IKKβ und IKKγ. Der IKK-Komplex phosphoryliert IκB. Dies resultiert in der Polyubiquitinierung und dem proteasomalen Abbau von IκB. Das p50/p65 Heterodimer wird freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren, wo es an NF-κB abhängige Enhancer und Promotoren bindet. Des Weiteren führt die Aktivierung von TAK1 zur Phosphorylierung von MKKs. Dies hat die Phosphorylierung von AP-1 zur Folge. Auch dieser Transkriptionsfaktor transloziert in den Zellkern und aktiviert die IL-1 vermittelte Genexpression pro-inflammatorischer Gene.

1.4 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, der Zellproliferation und dem Zelltod. NF-κB beschreibt eine Transkriptionsfaktor-Familie bestehend aus fünf Proteinen, welche insgesamt 15 verschiedene Homo- und Heterodimere bilden können: cRel, RelA (p65), RelB, p105/p50 (NF-κB1) und p100/p52 (NF-κB2) (Hoffmann et al., 2006; Meier-Soelch et al., 2021; Smale, 2012). Jede dieser Untereinheiten besitzt eine NF-κB/Rel Homologiedomäne (RHD) am N-Terminus, welche für die Homo- bzw. Heterodimerisierung und die DNA-Bindung

benötigt wird. Die Untereinheiten c-Rel, RelA (p65) und RelB haben zudem eine c-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) für die Induktion der Transkription. Die Untereinheiten p105/p50 (NF- κ B1) und p100/p52 (NF- κ B2) besitzen wiederum keine eigene TAD. Diese Untereinheiten liegen als Vorläuferproteine vor, welche entweder kotranslational (p105 zu p50) oder posttranslational (p100 zu p52) prozessiert werden. Lediglich die prozessierten Untereinheiten p50 und p52 bilden die DNA-bindenden Formen. Die verschiedenen NF- κ B Dimere binden an spezifische κ B-Motive in den Promotoren und Enhancern der Zielgene und regulieren die Transkription über die Rekrutierung weiterer Koaktivatoren oder Korepressoren (Bacher et al., 2021; Hayden and Ghosh, 2008; Meier-Soelch et al., 2021; Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Priester et al., 2022). Die κ B-Motive tauchen in vielen immunregulatorischen Genen auf (Natoli et al., 2005).

Die Aktivierung von NF- κ B findet sowohl über einen klassischen (kanonischen) als auch über einen nicht-kanonischen Signalweg statt. Bei dem nicht-kanonischen Signalweg vermittelt IKK α die Phosphorylierung von p100. Dies führt zur Prozessierung des Vorläuferproteins zu p52. Anschließend werden Dimere aus p52/RelB gebildet, welche in den Zellkern translozieren und die Genexpression spezifischer Zielgene induzieren (Kracht et al., 2020; Priester et al., 2022; Sentfleben et al., 2001; Xiao et al., 2004). Das Heterodimer aus p65 und p50 bildet den prototypischen NF- κ B Komplex. Die Translokation dieses Heterodimers in den Zellkern wird über den kanonischen Signalweg und damit beispielsweise durch IL-1 induziert (Abb. 1.1).

Insgesamt induziert das NF- κ B System transkriptionelle Signalwege, welche die angeborene und adaptive Immunität regulieren. Da NF- κ B somit eine zentrale Rolle bei der Entzündungsantwort spielt, bietet sich eine pharmakologische Inhibition dieses Transkriptionsfaktors bei der Behandlung von auto-inflammatorischen Erkrankungen an. Glukokortikoide wie beispielsweise Cortison hemmen NF- κ B und induzieren über den Glukokortikoidrezeptor die Expression von I κ B (Auphan et al., 1995; Deroo and Archer, 2001).

1.5 Die Rolle von NF- κ B in Tumorerkrankungen

NF- κ B spielt eine zentrale Rolle in Tumoren, da er an der Bildung einer tumorfördernden, inflammatorischen Umgebung beteiligt ist. Die „tumorfördernde Entzündung“ ist eines der sogenannten *hallmarks of cancer*. Bereits im 19. Jahrhundert beschrieb Rudolf Virchow eine mögliche Verbindung zwischen der Entzündung und Tumorerkrankungen. Er zeigte, dass Leukozyten einen Tumor infiltrierten (Capece et al., 2018; DiDonato et al., 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). Heutzutage ist bekannt, dass Tumore oft von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems infiltriert werden. Es entstehen inflammatorische Bedingungen in der Tumorumgebung, welche eine wichtige Rolle in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung spielen. Eine chronische Entzündung erhöht somit beispielsweise die Wahrscheinlichkeit einer Tumorerkrankung. Während der Entstehung des Tumors kann die

durch NF- κ B getriebene inflammatorische Umgebung die Mutationsrate erhöhen und die Proliferation der mutierten Zellen fördern. Auch die Tumorprogression ist abhängig von einer erhöhten Zellproliferation und reduziertem Zelltod. Diese Prozesse sind ebenfalls entzündungsgesteuert. Auch die Metastasierung des Tumors benötigt eine Kollaboration zwischen Krebszellen, Immunzellen und stromalen Elementen. Aufgrund der Kontrolle über die inflammatorische Antwort hat NF- κ B somit einen großen Einfluss auf die Tumorentstehung und die Progression. Zusätzlich ist NF- κ B in vielen Tumoren konstitutiv aktiviert. Die NF- κ B Aktivität korreliert mit einem schlechteren Überleben der Patienten, einer schnelleren Tumorwiederkehr und der eintretenden Chemoresistenz. Weiterhin führen funktionserhöhende Mutationen von *upstream* Aktivatoren von NF- κ B zur Formation von Tumoren (Capece et al., 2018; Diep et al., 2022; Grivennikov et al., 2010; Lalle et al., 2021; Riedlinger et al., 2018; Singh et al., 2019; Taniguchi and Karin, 2018).

Viele Zielgene von NF- κ B bzw. IL-1 codieren für Proteine, welche nach erfolgter Synthese von der Zelle sekretiert werden. Häufig handelt es sich hierbei um Chemokine. Das Tumormikromilieu und dessen Antitumor-Immunität wird somit stark durch NF- κ B und das NF- κ B-aktivierende IL-1 beeinflusst (Carmi et al., 2011).

Chemokine sind kleine, chemotaktische Proteine, welche die gerichtete Migration von Leukozyten kontrollieren. Ein klassisches Chemokin, dessen Genexpression über den NF- κ B Signalweg aktiviert wird, ist CXCL8/IL-8. Dieses Chemokin ist ein lokaler Entzündungsmediator, welcher eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis und Degranulation von Leukozyten spielt. Es bindet an die G-Protein gekoppelten CXCR1/2 Rezeptoren und induziert verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, die die Entzündungsreaktion beeinflussen (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992; Harada et al., 1994; Liu et al., 2016; Russo et al., 2014). Gleichzeitig hat IL-8 einen starken Einfluss auf die Angiogenese, die Metastasierung und das Tumorstadium (Fousek et al., 2021; Zhu et al., 2012). Anti-IL-8 Antikörper reduzieren die Tumordinfiltration durch Immunzellen, was zu einer besseren Prognose führen kann (Sparmann and Bar-Sagi, 2004). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass die Inhibition der CXCL8-CXCR1/CXCR2 Achse das Tumormikromilieu reprogrammiert. Die Inhibition von CXCR1/CXCR2 durch Reparixin führt in Mäusen mit Gliom zu einem langsameren Tumorstadium und einem verbesserten Überleben. Außerdem zeigen Mäuse, welche mit Anti-IL-8 Antikörpern behandelt wurden, ein verringertes Tumorstadium (Liu et al., 2023). Diese präklinischen Studien zeigen daher erneut die Bedeutsamkeit von NF- κ B in Tumorerkrankungen.

1.6 Cyclin-abhängige Kinasen

Weitere Proteine, welche eine bedeutsame Rolle in Tumorerkrankungen spielen, sind Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs). CDKs sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, deren enzymatische Aktivität und Substratspezifität durch die Interaktion mit spezifischen Cyclinen reguliert wird. In humanen Zellen gibt es insgesamt 20 CDKs, welche mit 29 verschiedenen Cyclinen interagieren (Cao et al., 2014; Lukasik et al., 2021; Malumbres et al., 2009). Bei den Cyclinen handelt es sich um kleine, regulatorische Untereinheiten ohne enzymatische Aktivität. Sie enthalten eine hochkonservierte Aminosäuresequenz bestehend aus ca. 100 Aminosäuren: die sogenannte Cyclin-Box. Diese ist verantwortlich für die CDK-Bindung und deren Aktivierung (Kobayashi et al., 1992; Nugent et al., 1991). Die Cycline weisen eine hohe Spezifität zu den CDKs auf. Dabei interagiert jede Kinase mit einem spezifischen Set aus Cyclinen (Morgan, 1995; Morgan, 1997). Ohne Cyclin-Bindung wird die ATP-Bindestelle der CDKs blockiert. Es wird eine starke Strukturveränderung benötigt, um die Kinaseaktivität zu ermöglichen. Die Bindung der Cycline führt zu einer Konformationsänderung in der Aktivierungsschleife (T-Schleife) der CDKs, welche die ATP-Bindung ermöglicht und die CDKs teilweise aktiviert. Zusätzlich wird die Aktivierungsschleife nach der Bindung eines Cyclins von CDK-aktivierenden Proteinkinasen (CAK) phosphoryliert. Die aktivierende Phosphorylierung eines Threonins nahe der ATP-Bindestelle ist notwendig, um die vollständige Kinaseaktivität des CDK-Cyclin-Komplexes zu erlangen (Jeffrey et al., 1995; Lukasik et al., 2021; Malumbres, 2014; Malumbres and Barbacid, 2001; Malumbres and Barbacid, 2005; Pavletich, 1999). Bei CDK7 handelt es sich um die wichtigste CAK, welche alle CDKs phosphorylieren kann (Fisher, 2012). Zusätzlich gibt es endogene CDK Inhibitoren, welche die CDK-Aktivität blockieren (Lim and Kaldis, 2013; Morgan, 1995).

CDKs lassen sich in zwei Gruppen unterscheiden. Zum einen gibt es CDKs, welche den Zellzyklus regulieren. Zum anderen sind einige CDKs wichtige Regulatoren der Genexpression.

1.6.1 Die Zellzyklus-assoziierten CDKs

Der Zellzyklus ist ein stark kontrollierter Vorgang, welcher in vier verschiedene Phasen unterteilt wird. Ziel ist die Kopie des genetischen Materials bzw. die Replikation der DNA und die Zellteilung, so dass letztendlich zwei Tochterzellen mit identischem Genom vorliegen. In der sogenannten G1-Phase ($G=gap$) bereiten sich die Zellen auf die DNA-Synthese vor. Dabei werden beispielsweise die benötigten Proteine für die Replikation synthetisiert. Anschließend folgt die Synthese-Phase (S-Phase). Die DNA wird während dieser Phase repliziert. Nach Beendigung der DNA-Synthese besteht jedes Chromosom aus zwei DNA-Doppelhelices. Die Zellen bereiten sich nun auf die Mitose bzw. die Zellteilung vor. Es handelt sich hierbei um die G2-Phase, in welcher erneut benötigte Proteine bereitgestellt werden. Die Phasen G1, S und G2 werden auch als Interphase zusammengefasst, da diese Phasen zwischen zwei

Zellteilungen liegen. In der anschließenden M-Phase wird der Zellkern bzw. die Chromosomen geteilt (Mitose) und die Aufteilung des Zytoplasmas (Zellteilung) findet statt. Es liegen schließlich zwei identische Tochterzellen vor. Die Zellen können nun die nächste Zellteilung vorbereiten. Alternativ können die Zellen arrestieren. Es handelt sich hierbei um die sogenannte G0- bzw. Ruhephase. Durch anti-mitogene Signale bzw. durch die Abwesenheit von mitogenen Signalen gehen die Zellen in diese Phase über (Berg et al., 2018; Malumbres and Barbacid, 2001; Matthews et al., 2022; Norbury and Nurse, 1992; Schafer, 1998; Vermeulen et al., 2003).

Die einzelnen Phasen des Zellzyklus werden dabei strikt von CDKs und den korrespondierenden Cyclinen gesteuert. Die Zellzyklus-assoziierten CDKs, darunter CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 und CDK7, regulieren sowohl den Fortschritt des Zellzyklus als auch die Zellteilung (Ding et al., 2020; Malumbres, 2014; Malumbres and Barbacid, 2005). Die Proteinmenge der Kinasen ändert sich dabei nicht. Die katalytische Aktivität der CDKs wird durch die Anwesenheit bzw. die Abwesenheit der Cycline reguliert (Traganos, 2014). In der frühen G1-Phase des Zellzyklus interagieren CDK4 und CDK6 mit Cyclin D, wodurch die Enzymaktivität beider Kinasen induziert wird und die Zielproteine phosphoryliert werden. Zu den Zielproteinen von CDK4/6 gehört beispielsweise Retinoblastom (Rb). Dieser Tumorsuppressor spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. Rb unterdrückt die Transkription von E2F Zielgenen und blockiert damit den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. Durch die CDK4/6-katalysierte Phosphorylierung wird Rb inaktiviert und der Transkriptionsfaktor E2F wird freigesetzt (Abb. 1.2). Folglich reguliert E2F Zielgene wie beispielsweise *CCNA2* und *CCNE1*, welche für Cyclin A bzw. Cyclin E codieren. Proteine für die DNA-Synthese und die Mitose werden bereitgestellt und der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase tritt ein (Adams, 2001; Burkhardt and Sage, 2008; Ding et al., 2020; Lim and Kaldis, 2013; Satyanarayana and Kaldis, 2009). Spezifische und ATP-kompetitive Inhibitoren von CDK4/6 (Palbociclib, Abemaciclib und Ribociclib) werden für die Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs eingesetzt. Die Inhibitoren verhindern die Phosphorylierung von Rb und damit den Austritt aus der G1-Phase, wodurch das Wachstum und die Verbreitung des Tumors unterdrückt wird (Kwapisz, 2017). Die induzierte Expression von Cyclin E1 und Cyclin E2 führt zu deren Interaktion mit CDK2, welche dadurch in der späten G1-Phase aktiviert wird. CDK2 phosphoryliert unter anderem Proteine, welche notwendig für die DNA-Replikation (Replikationsfaktor A und C), die Centrosom-Duplikation und die Histonsynthese sind. Des Weiteren komplettiert CDK2 die Phosphorylierung von Rb, um die Aktivierung der E2F-gesteuerten Genexpression zu vollenden. Dadurch wird die S-Phase initiiert (Galderisi et al., 2003; Ohtsubo et al., 1995). Im Verlauf des Zellzyklus wird Cyclin E durch Cyclin A verdrängt und degradiert, um eine erneute Replikation zu verhindern (Hwang and Clurman, 2005). Der Komplex, bestehend aus CDK2 und Cyclin A, steuert das Fortschreiten der S-Phase durch die

Phosphorylierung von Proteinen, welche eine wichtige Rolle bei der DNA-Synthese spielen (zum Beispiel CDC6) (Petersen et al., 1999; Yam et al., 2002). Während des Übergangs in die M-Phase bindet Cyclin A an CDK1. Diese Interaktion und die damit verbundene Aktivität von CDK1 ist entscheidend für die Initiation der Prophase der Mitose (Furuno et al., 1999). Während der späten G2-Phase bzw. der frühen M-Phase wird Cyclin A degradiert und Cyclin B interagiert stattdessen mit CDK1, um die Mitose zu fördern und zu beenden. Der Komplex CDK1/Cyclin B ist beispielsweise für die Kondensation der Chromosomen und die Assemblierung der mitotischen Spindeln verantwortlich (Ding et al., 2020; Malumbres and Barbacid, 2001; Satyanarayana and Kaldis, 2009). Der CAK-Komplex, bestehend aus CDK7 und Cyclin H, ist während des gesamten Zellzyklus aktiv. Außerdem gibt es verschiedene endogene Inhibitoren, welche die Zellzyklus-assoziierten CDKs inhibieren und damit den Zellzyklus kontrollieren. Zum einen binden und inhibieren die Inhibitoren der INK4 Familie ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ und $p19^{INK4d}$) CDK4 und CDK6. Zum anderen werden die Komplexe CDK2/CyclinE, CDK2/CyclinA, CDK1/CyclinA und CDK1/CyclinB durch Proteine der Cip/Kip Familie ($p21^{Cip1}$, $p27^{Cip2}$ und $p57^{Kip2}$) inhibiert (Pavletich, 1999; Sherr and Roberts, 1995; Vermeulen et al., 2003).

Eine gestörte Zellproliferation gehört wie auch die tumorfördernde Entzündung zu den sogenannten *hallmarks of cancer* (Hanahan and Weinberg, 2011). Die Regulation des Zellzyklus steht zudem in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B bzw. der Entzündungsreaktion. NF- κ B fördert beispielsweise die Expression von anti-apoptotischen und proliferativen Genen (Kucharczak et al., 2003). Außerdem reguliert NF- κ B die Expression von Cyclin D1 und Cyclin E und kontrolliert damit das Zellwachstum (Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass Palbociclib, der selektive CDK4/6 Inhibitor, die NF- κ B induzierte Genexpression stark supprimiert. CDK6 phosphoryliert die NF- κ B Untereinheit p65 an Serin536. Zudem wurde CDK6 an aktiven NF- κ B Promotoren gefunden. Arbeiten der AG Kracht zeigten zudem, dass CDK6 die Rekrutierung von p65 zum *IL8* Locus fördert und eine erhöhte Funktion von CDK6 zu einer erhöhten Expression von *IL8* führt (Buss et al., 2012; Handschick et al., 2014).

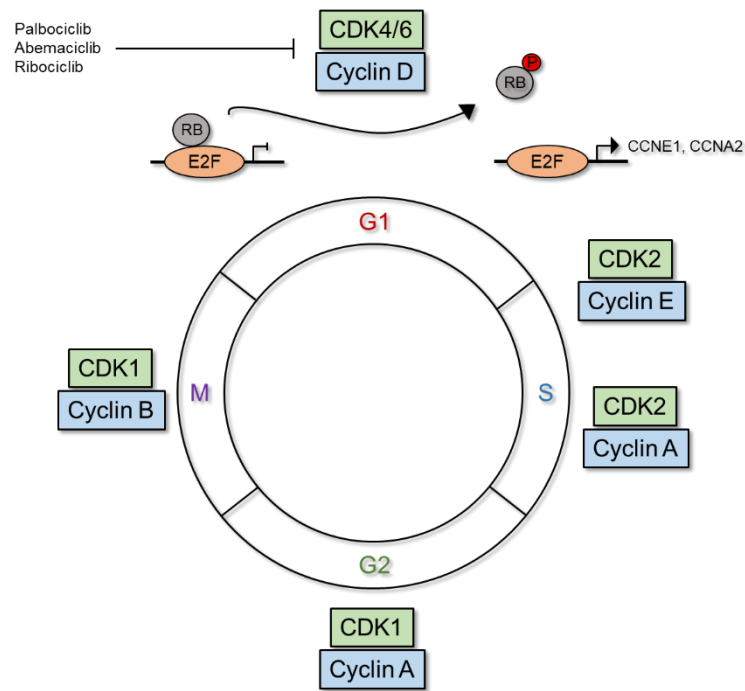


Abb. 1.2 Die Regulation des Zellzyklus durch Cyclin-abhängige Kinasen.

Während der G1-Phase des Zellzyklus interagiert Cyclin D mit CDK4/6, welche daraufhin Retinoblastom (Rb) phosphorylieren. Diese Phosphorylierung erlaubt die Aktivierung der E2F-gesteuerten Genexpression und den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. CDK2/Cyclin E leitet die DNA-Replikation ein. Im weiteren Verlauf steuert der Komplex bestehend aus CDK2 und Cyclin A das Fortschreiten der Replikation und der Übergang zur G2-Phase wird reguliert. Anschließend interagiert Cyclin A mit CDK1 und die Mitose wird eingeleitet. Cyclin A wird degradiert und Cyclin B interagiert mit CDK1, um die Mitose weiter zu fördern und zu beenden.

1.6.2 Die transkriptionellen CDKs

Bei der Transkription wird die genetische Information der DNA als Vorlage für die Synthese einer komplementären RNA verwendet. Diese RNA-Synthese wird von RNA-Polymerasen katalysiert. In eukaryotischen Zellen gibt es vier verschiedene RNA-Polymerasen. RNA-Polymerase II ist für die Synthese der sogenannten *messenger* RNA (mRNA) verantwortlich. Diese enthält die genetische Information für die Aminosäuresequenz eines Proteins (Berg et al., 2018). Die Transkription wird in drei Phasen unterteilt: die Initiation, die Elongation und die Termination. Während der Initiation wird der Prä-Initiationskomplex im Promotorbereich eines Gens zusammengebaut. Das TATA-Bindeprotein, welches ein Teil von TFIID ist, bindet die sogenannte TATA-Box, welche sich ca. 30 bp vor dem Transkriptionsstart befindet. Anschließend werden weitere Transkriptionsfaktoren (TF) rekrutiert. TFIIA stabilisiert dabei die Bindung von TFIID, während TFIIB und TFIIF die RNA-Polymerase rekrutieren. Zusätzlich vermittelt TFIIE die Bindung des Transkriptionsfaktors TFIIH, welcher eine ATP-abhängige Helikasefunktion besitzt und die DNA nahe des Promotors entwindet (Buratowski, 2000; Cramer, 2019; Orphanides et al., 1996). Nach der Initiation pausiert die Polymerase durch die Anwesenheit der negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF. Der temporäre Stopp der RNA-Polymerase II erlaubt beispielsweise die Rekrutierung von Enzymen, welche die RNA-Prozessierung (z.B. das *capping*) steuern. Der positive Elongationsfaktorkomplex p-TEFb

inhibiert wiederum DSIF und NELF und erlaubt den Übergang in die produktive Elongationsphase (Cramer, 2019; Yamaguchi et al., 1999; Zhou and Yik, 2006). Während der Elongation wird die zur DNA komplementäre RNA in 5'-3' Richtung synthetisiert. Die RNA-Polymerase katalysiert die Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung. Dabei greift die 3' Hydroxylgruppe des letzten Nukleotids nukleophil die α -Phosphatgruppe des neuen Nukleosidtriphosphats an. Die Elongation ist ein prozessiver Prozess, welcher durch verschiedenste Elongationsfaktoren begleitet wird (Berg et al., 2018; Conaway and Conaway, 1999; Conaway et al., 2000). Die Termination der Transkription ist direkt mit der Polyadenylierung verknüpft. Die RNA-Polymerase transkribiert am Ende eines Gens über die sogenannte Polyadenylierungsstelle hinweg (AAUAAA). Dies leitet die Termination der Transkription ein. Die Freisetzung und Polyadenylierung der RNA findet 10-30 nt *downstream* des Polyadenylierungssignals und 30 nt *upstream* einer GU-reichen Region statt. CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) und CSTF (*cleavage stimulation factor*) erkennen diese beiden Sequenzen. CPSF73 besitzt eine Endonukleaseaktivität und katalysiert die Spaltung und die damit verbundene Freisetzung der RNA (Richard and Manley, 2009). In eukaryotischen Zellen ist die Transkription direkt (ko-transkriptionell) an einige Prozessierungsschritte gekoppelt. Die mRNA wird während der Transkription mit einer 7-Methylguanosin-Kappe (Cap) am 5'-Ende versehen. Des Weiteren werden nicht-codierende Introns durch das Spleißosom entfernt und die protein-codierenden Exons verknüpft. Nach der Spaltung der mRNA wird das 3' Ende außerdem polyadenyliert (Bentley, 2014).

Eine besondere Rolle bei der Transkription spielt die C-terminale Domäne (CTD) von RNA-Polymerase II. Es handelt sich hierbei um eine Verlängerung der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II (RBP1). Die CTD besteht in humanen Zellen aus 52 Wiederholungen des Heptapeptids Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Jede dieser Aminosäuren kann post-translational modifiziert werden. Ser2, Ser5, Ser7, Tyr1 und Thr4 können beispielsweise phosphoryliert werden. Durch die verschiedenen Modifikationen wird die Konformation der RNA-Polymerase verändert, wodurch die Aktivität beeinflusst wird. Die unterschiedlichen CTD-Modifikationen erfolgen sehr dynamisch und erlauben im Verlauf der Transkription die Rekrutierung verschiedener regulatorischer Faktoren (Jeronimo et al., 2013; Saunders et al., 2006). Die CTD interagiert je nach Phosphorylierungsstatus mit Histon-Methyltransferasen, *capping*-Enzymen, Spleißfaktoren oder den Faktoren für die Polyadenylierung und koppelt dadurch die Transkription an Histon-Methylierungen, *capping*, Spleißen und Polyadenylierung. Der sogenannte „CTD-Code“ beschreibt die unterschiedlichen Kombinationen aus CTD-Modifikationen, welche unterschiedliche Interaktionsflächen für die verschiedenen regulatorischen Faktoren schaffen. Somit bestimmt der CTD-Code die Position der RNA-Polymerase II im Transkriptionszyklus (Buratowski, 2003; Jasnovidova and Stefl, 2013). Hauptsächlich wird die CTD dabei von CDKs phosphoryliert. Die transkriptionellen CDKs,

darunter CDK7, CDK8, CDK9, CDK12 und CDK13, beeinflussen über diesen Mechanismus mittels der Phosphorylierung der CTD die Genexpression (Malumbres, 2014). Im Gegensatz zu den Zellyklus-assozierten CDKs sind die transkriptionellen CDKs permanent mit den korrespondierenden Cyclinen assoziiert. Sie werden als Teil eines größeren Komplexes zum Chromatin rekrutiert (Fisher, 2012). Die noch unphosphorylierte RNA-Polymerase wird während der Initiation von dem Prä-Initiationskomplex rekrutiert (Egloff and Murphy, 2008; Phatnani and Greenleaf, 2006). Während der Initiation wird die CTD von RNA-Polymerase II, welche sich in Nähe des Promotors befindet, von CDK7 an Ser5 phosphoryliert (Abb. 1.3). CDK7 ist dabei Teil des Transkriptionsfaktor-Komplexes TFIIF, der außerdem noch Cyclin H und MAT1 enthält (Greber et al., 2020). Die CTD ist somit lediglich an Ser5 phosphoryliert und die transkriptionelle Initiation wird reguliert (Orphanides et al., 1996; Serizawa et al., 1995). Über die Ser5-Phosphorylierung der CTD werden außerdem die benötigten *capping*-Enzyme rekrutiert (Buratowski, 2003; Fabrega et al., 2003; Schroeder et al., 2000). Zudem phosphoryliert CAK/CDK7 die Kinase CDK9 in ihrer Aktivierungsschleife und sorgt somit für die vollständige enzymatische Aktivität dieser Kinase (Larochelle et al., 2012). CDK9/CyclinT ist Teil des Elongationsfaktor-Komplexes p-TEFb, welcher den Eintritt in die Elongationsphase der Transkription reguliert. CDK9 phosphoryliert zudem die CTD an Ser2 und steuert somit die Elongation und den Start der RNA-Prozessierung (Bartkowiak and Greenleaf, 2011; Peterlin and Price, 2006). Auch CDK12 und CDK13, welche mit Cyclin K interagieren, sind Elongations-assozierte Kinasen, welche Ser2 der CTD *downstream* von CDK9 phosphorylieren (Bartkowiak et al., 2010; Cheng et al., 2012; Greenleaf, 2019; Tellier et al., 2020). Während der Transkription nimmt die Phosphorylierung von Ser2 der CTD entlang des Gens stetig zu, während die Ser5-Phosphorylierung ihren Höchststand in der Nähe des Promotors und des Transkriptionsstarts erreicht. Im Verlauf der Transkription wird Ser5 dephosphoryliert. Die simultane Phosphorylierung von Ser2 und Ser5 steuert das Spleißen, während die alleinige Phosphorylierung von Ser2 am Ende des Gens für die Rekrutierung der Polyadenylierungsfaktoren und der Terminationsmaschinerie sorgt (Ahn et al., 2004; Egloff and Murphy, 2008; Harlen and Churchman, 2017; Komarnitsky et al., 2000). Somit steuern die transkriptionellen CDKs den Fortschritt der Transkription über unterschiedliche Phosphorylierungen der CTD von RNA-Polymerase II. Des Weiteren ist CDK8 Teil des Mediator-Komplexes. Hierbei handelt es sich um einen Aktivatorkomplex, welcher Signale von den Transkriptionsfaktoren zur Polymerase sendet (Allen and Taatjes, 2015).

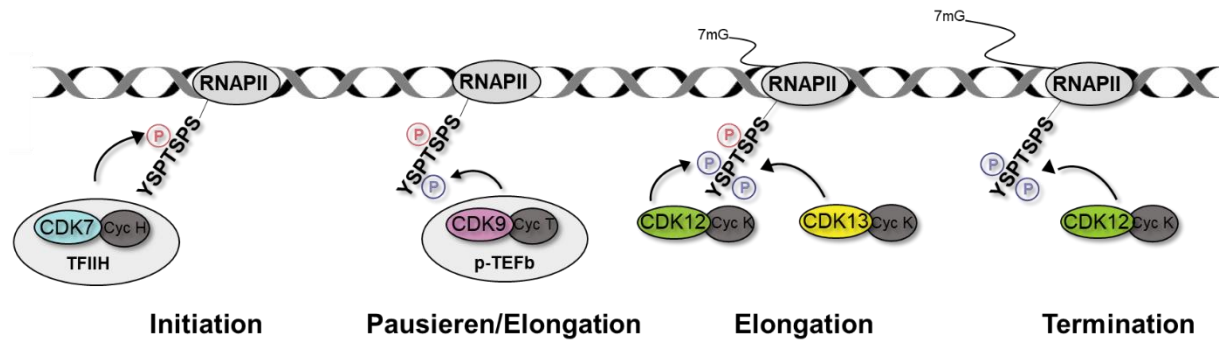


Abb. 1.3 Regulation der Transkription durch Cyclin-abhängige Kinasen.

Als Teil des TFIIF-Komplexes phosphoryliert CDK7/CyclinH die CTD der RNA-Polymerase II an Ser5 während der Initiation der Transkription. CDK9/CyclinT ist Teil des Elongationsfaktor-Komplexes p-TEFb, welcher den Eintritt in die Elongationsphase der Transkription kontrolliert. Dabei phosphoryliert CDK9 die CTD an Ser2. *Downstream* von CDK9 phosphorylieren auch CDK12 und CDK13, welche mit CyclinK interagieren, Ser2 der CTD, um die Elongation zu steuern. Die Ser2-Phosphorylierung nimmt somit entlang des Gens in 5'-3' Richtung zu, während die Phosphorylierung an Ser5 abnimmt. Über die unterschiedlichen Stadien der CTD-Phosphorylierung wird die Transkription und die damit verbundenen RNA-Prozessierungen gesteuert (Chou et al., 2020).

1.7 Die Funktionen von CDK12

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei CDK12 um eine Elongations-assoziierte CDK, welche Ser2 der CTD von RNA-Polymerase II während der transkriptionellen Elongation phosphoryliert. CDK12 und die homologe Kinase CDK13 weisen eine Sequenzhomologie von 43 % auf, während die Kinasedomäne zu 93 % identisch ist. Beide CDKs interagieren vorzugsweise mit Cyclin K. Außerdem interagieren CDK12 und CDK13 mit den Cyclinen L1 und L2. Allerdings ist die Interaktion mit Cyclin K kritisch für die Phosphorylierung der CTD (Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Cheng et al., 2012; Kohoutek and Blazek, 2012; Lui et al., 2018). Des Weiteren besitzen CDK12 und CDK13 im Vergleich zu den übrigen CDKs ein großes Molekulargewicht (165 kDa). Die Kinasedomänen befinden sich jeweils im Zentrum der Kinasen. Beide Kinasen besitzen zudem N-terminale Arginin- und Serin-reiche Motive (RS-Motive), welche beispielsweise für die Assemblierung mit Spleißfaktoren bekannt sind. Zusätzlich haben beide Kinasen mehrere Prolin-reiche Regionen (Kohoutek and Blazek, 2012; Malumbres, 2014; Pilarova et al., 2020). Trotz der ausgeprägten Sequenzhomologie gibt es Hinweise dafür, dass sich die Funktionen von CDK12 und CDK13 unterscheiden.

Insbesondere CDK12 ist eine molekular relativ gut untersuchte Kinase, welche essentielle Funktionen in der Zelle übernimmt. Als Elongations-assoziierte CDK lokalisiert CDK12 an den Promotoren und in den Genkörpern. Die Chromatinbindung von CDK12 überlappt dabei mit der Bindung der RNA-Polymerase, was darauf schließen lässt, dass sich CDK12 zusammen mit der Polymerase entlang des Gens bewegt (Bartkowiak et al., 2010; Pilarova et al., 2020; Zhang et al., 2016). CDK12 kann sowohl Ser2 als auch Ser5 der CTD phosphorylieren. Die Aktivität von CDK12 wird für eine stabile Assoziation von Elongations- und Terminationsfaktoren benötigt. Außerdem koppelt CDK12 die Transkription an die Polyadenylierung, da die Ser2-Phosphorylierung zur Rekrutierung der

Polyadenylierungsfaktoren führt (Ahn et al., 2004; Bosken et al., 2014; Davidson et al., 2014; Tellier et al., 2020). Die Phosphorylierung der CTD durch CDK12 ist damit essentiell für eine effiziente und optimale Transkription. Eine Inhibition bzw. Inaktivierung von CDK12 führt zu einer veränderten Phosphorylierung der CTD, was eine verlangsamte Elongation und eine frühzeitige Termination der Transkription zur Folge hat. Die Termination der Transkription erfolgt bei inaktiven CDK12 bevorzugt an intronischen Polyadenylierungsstellen (IPA), so dass keine vollständige mRNA synthetisiert wird und kein funktionsfähiges Protein entstehen kann (Abb. 1.4). Es kommt zu einem transkriptionellen Defekt (Choi et al., 2020; Chou et al., 2020; Dubbury et al., 2018; Pilarova et al., 2020).

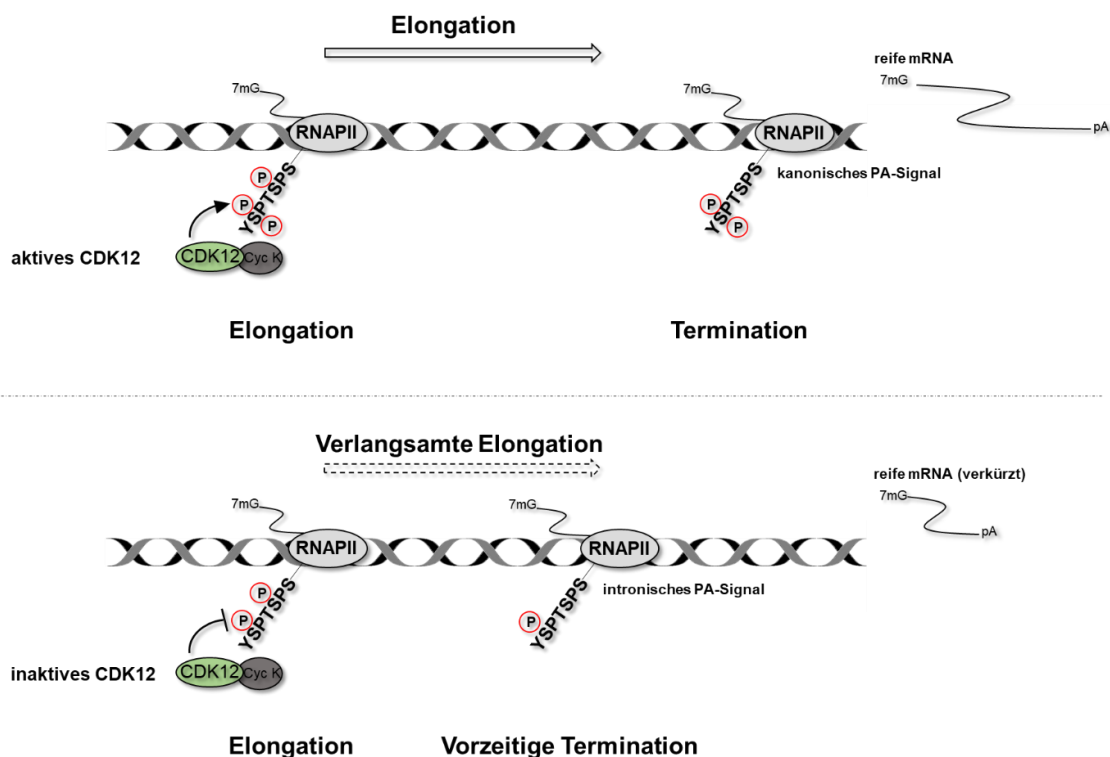


Abb. 1.4 Einfluss einer CDK12 Inaktivierung auf die Transkription. CDK12/CyclinK phosphoryliert die CTD an Ser2 und ermöglicht eine effiziente Elongation. Die Termination der Transkription erfolgt an kanonischen Polyadenylierungsstellen (PA). Ist CDK12 inaktiviert, ist der Phosphorylierungsstatus der CTD verändert. Dies führt zu einer verlangsamten Elongation und die Termination erfolgt frühzeitig an intronischen Polyadenylierungsstellen (IPA). Es kommt zu einem transkriptionellen Defekt, da unvollständige mRNAs entstehen (Pilarova et al., 2020).

Besonders betroffen von diesem Defekt sind dabei Gene, welche eine hohe Anzahl an IPAs besitzen. Außerdem beeinflusst die Inaktivierung von CDK12 vor allem lange Gene, welche viele Exons besitzen. Aus diesem Grund sind hauptsächlich DNA-Reparaturgene (z.B. *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* und *ATR*) und Replikationsgene betroffen. Es kommt zu einem globalen Defekt der DNA-Reparatur, wobei vor allem die homologe Rekombination betroffen ist. Die homologe Rekombination dient der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. CDK12 hält die Genomstabilität aufrecht und eine Inaktivierung hat eine erhöhte Instabilität des Genoms zur Folge (Blazek et al., 2011; Dubbury et al., 2018; Joshi et al., 2014; Krajewska et al., 2019;

Liang et al., 2015). Die Beeinflussung der Replikationsgene resultiert zudem in einem Replikationsstress der Zellen (Chirackal Manavalan et al., 2019).

Des Weiteren wird CDK12 eine essentielle Rolle bei dem Spleißvorgang zugeschrieben. CDK12 besitzt 21 RS-Motive, welche auf eine Funktion in der RNA-Prozessierung hinweisen. Außerdem ko-lokalisiert CDK12 mit SC35, einer Komponente des Spleißosoms, in sogenannten nuklearen „*speckles*“. Des Weiteren phosphoryliert CDK12 eine Untereinheit der U1 snRNP (Bartkowiak and Greenleaf, 2015; Ko et al., 2001; Tien et al., 2017).

Doch nicht nur in der Transkription spielt CDK12 eine Rolle, sondern auch bei der Translation. Zusammen mit mTOR phosphoryliert CDK12 den Translationsrepressor 4E-BP1 und kontrolliert damit die Bindung des Translationsinitiationsfaktors eIF4G. Dieser reguliert die Translation der mTOR Zielproteine, wodurch das Zellwachstum gesteuert wird. Ist CDK12 inaktiv, wird die Phosphorylierung von 4E-BP1 verringert, was eine verminderte Translation zur Folge hat. Beeinflusst werden dabei vor allem Proteine für die Mitose. Es kommt zu einem mitotischen Defekt bzw. zu einem Segregationsdefekt (Choi et al., 2020; Choi et al., 2019; Pilarova et al., 2020).

Auch die homologe Kinase CDK13 lokalisiert in nuklearen *speckles* und interagiert dort mit Spleißfaktoren (Chen et al., 2007; Even et al., 2006). Auch das Spleißen viraler (HIV) mRNA wird durch CDK13 reguliert (Berro et al., 2008). CDK13 kann ebenfalls Ser2 und Ser5 der CTD phosphorylieren. Zudem reguliert CDK13 die Expression von Genen, welche an Wachstumsprozessen beteiligt sind (Fan et al., 2020; Greifenberg et al., 2016). Allerdings scheint die Depletion von CDK13 keinen Einfluss auf DNA-Reparaturgene zu haben (Blazek et al., 2011; Krajewska et al., 2019; Liang et al., 2015). Kürzlich wurden der Translationsrepressor 4E-BP1 und der Translationsinitiationsfaktor eIF4B als Substrate von CDK13 identifiziert. Eine simultane Inhibition von CDK13 und mTORC1 (durch Rapamycin) blockiert die Proteinsynthese und induziert den Zelltod. CDK13 spielt somit ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese (Wu et al., 2023).

1.8 CDK12/13 als potentielle therapeutische Angriffspunkte und Biomarker

Da CDK12 diverse Funktionen für die Aufrechterhaltung der Genomstabilität besitzt und ein Funktionsverlust Tumorerkrankungen zur Folge haben kann, wird CDK12 auch als Tumorsuppressor angesehen. Eine Genominstabilität gehört ebenfalls zu den *hallmarks of cancer* (Hanahan and Weinberg, 2011). Eine erhöhte Aktivität von CDK12 (durch Genamplifikation der *gain of function* Mutanten) hätte wiederum eine erhöhte Genomstabilität zur Folge, die als gegenteiliger Effekt sogar zum verbesserten Überleben der Krebszellen beitragen könnte. CDK12 kann somit sowohl als Biomarker bzw. Tumorsuppressor als auch als potentieller therapeutischer Angriffspunkt gesehen werden (Lui et al., 2018). Genomische Veränderungen von *CDK12* treten sehr häufig in den verschiedensten Tumoren auf. Im

Ovarialkarzinom, bei Brustkrebs und bei Lungen-Adenokarzinomen treten häufig funktionsvermindernde Mutationen auf. Aber auch Amplifikationen sind sehr üblich in den unterschiedlichsten Tumorerkrankungen. Im Ovarialkarzinom tritt *CDK12* außerdem als eines der 10 am häufigsten mutierten Gene auf (Cancer Genome Atlas Research, 2011; Choi et al., 2020; Ekumi et al., 2015; Liu et al., 2021b; Lui et al., 2018; Pilarova et al., 2020). Die Mutationen treten dabei hauptsächlich in der Kinasedomäne auf, wodurch die katalytische Aktivität von *CDK12* beeinflusst wird (Ekumi et al., 2015; Joshi et al., 2014; Lui et al., 2018).

Wie bereits beschrieben reguliert *CDK12* die Expression von *BRCA1* und *BRCA2*, welche eine entscheidende Rolle in der homologen Rekombination spielen. Es handelt sich hierbei ebenfalls um Tumorsuppressoren. Ein Verlust von *BRCA* führt zu DNA-Schäden und Replikationsstress. Genomische Veränderungen von *CDK12* generieren somit eine funktionslose homologe Rekombination, was endogene DNA-Schäden zur Folge hat. Es kommt zur Genominstabilität. Außerdem wird die Sensitivität für DNA-schädigende Stoffe erhöht (Blazek et al., 2011; Gaillard et al., 2015; Lui et al., 2018; Quereda et al., 2019). Synthetische Letalität wird erreicht, wenn Zellen durch die (*CDK12*-abhängige) Inaktivierung von zwei Genen nicht mehr in der Lage sind, DNA-Schäden zu reparieren. Dies erfolgt z.B. bei dualer Inaktivierung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (*PARP*) und *BRCA*. *PARP* ist verantwortlich für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen der DNA über die sogenannte Basen-Exzisionsreparatur. Ist zusätzlich auch die homologe Rekombination durch die Inaktivierung von *BRCA1/2* gestört, können Strangbrüche der DNA nicht mehr repariert werden. Daher werden *PARP* Inhibitoren beispielsweise bei Brustkrebs oder Ovarialkarzinomen eingesetzt, wenn eine *BRCA1/2* Mutation und damit ein Funktionsverlust dieser Tumorsuppressoren vorliegt. Die Therapie mit *PARP* Inhibitoren ist daher limitiert auf Patientinnen mit validierter *BRCA1/2* Mutation. Eine zusätzliche Inaktivierung von *CDK12* macht die Zellen sensibler für die Behandlung mit *PARP* Inhibitoren, da auch auf diesem Weg die Expression von *BRCA1/2* supprimiert wird. Die Kombination aus *PARP* Inhibitoren und *CDK12* Inhibitoren kann daher ebenfalls synthetische Letalität induzieren und *CDK12* ist somit ein möglicher therapeutischer Ansatz für die Erhaltungstherapie von fortgeschrittenem, metastasierendem Brustkrebs (Bajrami et al., 2014; Cortesi et al., 2021; Iniguez et al., 2018; Quereda et al., 2019; Sonnenblick et al., 2015).

Die bi-allelische Inaktivierung von *CDK12* induziert einen einzigartigen Phänotyp der Genominstabilität. Es entstehen sogenannte fokale Tandem-Duplikationen. Dabei treten vermehrt Genfusionen auf. Bei einer Inaktivierung von *CDK12* entstehen bis zu 800 Tandem-Duplikationen, welche zufällig im Genom verteilt sind und auf jedem Chromosom auftreten. Dabei entstehen vermehrt Neoantigene, welche durch das Immunsystem erkannt werden und eine verstärkte Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen im Tumormikromilieu hervorrufen könnten. Aus diesem Grund wären Zellen mit inaktiven *CDK12* sensibler für die sogenannte

Immun-Checkpoint-Therapie mittels PD-1 oder PD-L1 Inhibitoren. Die Interaktion zwischen PD-1 (T-Zelle) und PD-L (auf einer Gewebszelle) inaktiviert die Funktion der T-Zellen während einer natürlicherweise ablaufenden transienten Immunreaktion im Gewebe. Durch Überexpression von z.B. PD-L1 „missbrauchen“ Krebszellen diesen Mechanismus der Immunkontrolle und schützen sich effektiv vor der Zerstörung durch cytotoxische T-Zellen. Durch die therapeutische Inhibition der PD-1/ PD-L1 Interaktion im Tumorgewebe mittels monoklonaler Antikörper, werden die T-Zellen wieder reaktiviert. Ein erhöhtes Neoantigenrepertoire durch eine CDK12/13 Inhibition bzw. einen genetischen Verlust von CDK12 erhöht daher die Effektivität einer gleichzeitigen Gabe von PD-1 oder PD-L1 Inhibitoren (Antonarakis et al., 2020; Li et al., 2020; Pardoll, 2012; Popova et al., 2016; Wu et al., 2018).

1.8.1 Pharmakologische Perturbationsmöglichkeiten von CDK12 und CDK13

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um (Cyclin-abhängige) Kinasen pharmakologisch zu perturbieren. Eine Möglichkeit ist die Inhibition der Kinaseaktivität. Hierfür stehen verschiedene niedermolekulare Inhibitoren zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden die beiden CDK Inhibitoren Flavopiridol und THZ531 für funktionelle Studien eingesetzt. Flavopiridol ist ein sogenannter pan-CDK Inhibitor (Abb. 1.5), welcher ATP-kompetitiv mehrere CDKs inhibiert. Einerseits inhibiert Flavopiridol die Zellzyklus-assoziierten CDKs (CDK1, CDK2, CDK4/6) und führt somit einen Arrest des Zellzyklus herbei. Andererseits hemmt Flavopiridol CDK7 und CDK9, welche wie zuvor ausgeführt eine wichtige Rolle bei der Transkription spielen. Es wurde gezeigt, dass bei niedrigen Dosen der transkriptionelle Hemmeffekt von Flavopiridol den überwiegenden Phänotyp darstellt, da CDK9 bereits bei einer 5-10-fach geringeren Dosis inhibiert wird (Blagosklonny, 2004; Kelland, 2000). Weiterhin wurde in dieser Arbeit der selektive CDK12/13 Inhibitor THZ531 verwendet. THZ531 ist ein kovalenter Inhibitor, der an ein Cystein (Cys 1039 für CDK12 und Cys 1017 für CDK13) außerhalb der Kinasedomäne bindet. Die Inhibition ist damit irreversibel (Zhang et al., 2016).

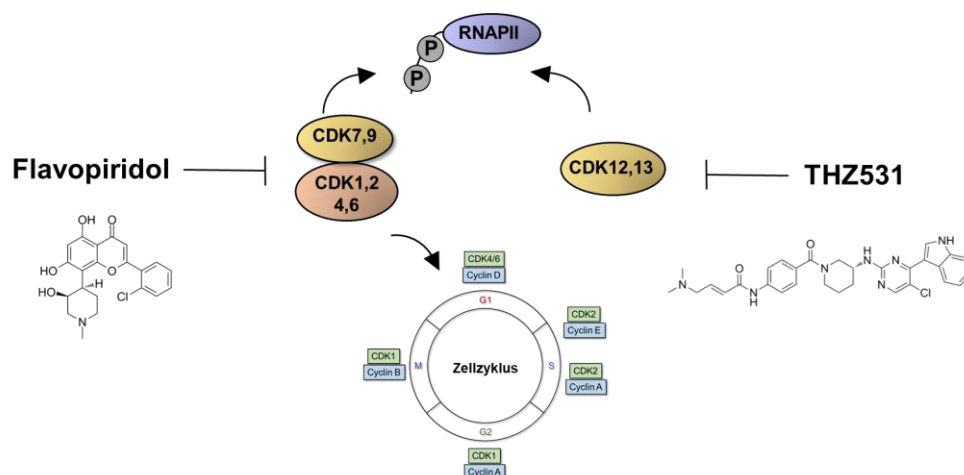


Abb. 1.5 Zielmoleküle der in dieser Arbeit verwendeten CDK Inhibitoren Flavopiridol und THZ531.

Flavopiridol inhibiert sowohl Zellzyklus-assoziierte CDKs (CDK1,2,4/6) als auch transkriptionelle CDKs (CDK7,9). Dagegen ist THZ531 ein selektiver CDK12/13 Inhibitor.

Eine weitere Möglichkeit der pharmakologischen CDK Perturbation bieten sogenannte *proteolysis targeting chimera* oder PROTACs. Es handelt es sich hierbei um eine zellpermeable, niedermolekulare Substanz, welche eine intrazelluläre Degradation seines Zielproteins verursacht. PROTACs bestehen aus zwei verschiedenen Liganden, welche kovalent über einen Linker miteinander verknüpft sind. Ein Ligand bindet das Zielprotein während der andere Ligand für die Rekrutierung einer E3 Ubiquitin Ligase verantwortlich ist. Durch die Bindung des PROTACs an das Zielprotein und die E3 Ligase, werden diese in räumlich Nähe gebracht. Dies resultiert in der K48-Ubiquitinierung des Zielproteins, was wiederum den proteasomalen Abbau zur Folge hat. Der PROTAC verursacht somit eine intrazelluläre Proteolyse (Bekes et al., 2022; Nalawansha and Crews, 2020). Jiang et al. haben in 2021 einen PROTAC entwickelt, welcher spezifisch gegen CDK12 gerichtet ist. Als Gerüst wurde der Cereblon (CRBN)-abhängige Multi-Kinase PROTAC TL12-186 verwendet. Das 4-(1-Piperazinyl)-anilin von TL12-186 wurde durch ein (R)-3-Aminopiperidin ersetzt, um den spezifischen CDK12-PROTAC **BSJ-4-116** zu erzeugen. Das (R)-3-Aminopiperidin stammt dabei aus dem selektiven CDK12/13 Inhibitor THZ531 (Jiang et al., 2021). Im Gegensatz zur Hemmung der enzymatischen Aktivität bzw. der Kinaseaktivität, sorgt BSJ-4-116 somit für eine Degradation des kompletten CDK12 Proteins (Abb. 1.6).

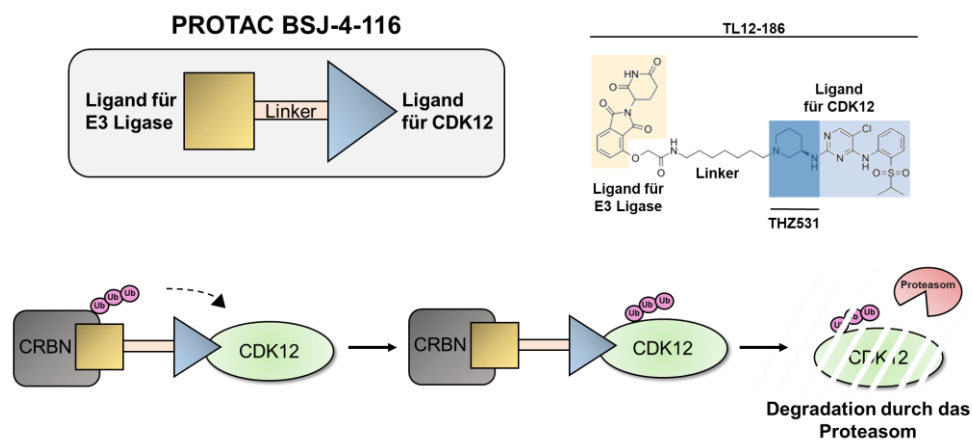


Abb. 1.6 Funktionsweise des PROTACs BSJ-4-116.

Der PROTAC besteht aus zwei Liganden, welche kovalent über einen Linker verbunden sind. Ein Ligand bindet spezifisch an CDK12 während der zweite Ligand die E3 Ligase Cereblon (CRBN) bindet und somit rekrutiert. Dies resultiert in der Ubiquitinierung von CDK12 und dem Abbau durch das Proteasom. Die Struktur von BSJ-4-116 basiert auf dem CRBN-abhängigen Multi-Kinase PROTAC TL12-186. Das 4-(1-Piperazinyl)-anilin von TL12-186 wurde durch ein (R)-3-Aminopiperidin ersetzt, welches aus dem selektiven CDK12/13 Inhibitor THZ531 stammt (Jiang et al., 2021).

1.9 Das Sekretom der Zelle im Kontext der Genexpression

Das Sekretom beschreibt die Gesamtheit aller Faktoren, die von einer Zelle in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Agrawal et al., 2010; Tjalsma et al., 2004; Uhlen et al., 2019). Sekretierte Faktoren sind beispielsweise Chemokine, Hormone, Verdauungsproteine, Antikörper, Kolonie-stimulierende Faktoren, Interferone, Tumor-

Nekrose-Faktoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Vesikel (EV) und microRNAs. Diese Faktoren werden entweder individuell oder in Vesikeln abgegeben (da Cunha et al., 2019; Paltridge et al., 2013; Ritchie et al., 2021; Zhang et al., 2018). Bei Zytokinen und der Untergruppe der Chemokine handelt es sich beispielsweise um typische Botenstoffe, welche im Rahmen einer Immunreaktion von Zellen verstärkt synthetisiert und sekretiert werden, um z.B. Leukozyten in einen geschädigten Gewebereich zu rekrutieren und zu reprogrammieren (Dyer, 2020; Stanley and Lacy, 2010; Turner et al., 2014). Das Sekretom spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler essentieller biologischer Prozesse. Es steuert beispielsweise die Zell-Zell-Kommunikation und die Immunantwort über lokale und systemische Signalwege (da Cunha et al., 2019; Ritchie et al., 2021; Uhlen et al., 2019). Die Zusammensetzung des Sekretoms ist in vielen Krankheiten wie beispielsweise bei Tumorerkrankungen verändert (Song et al., 2019; Stastna and Van Eyk, 2012). Dies hat Einfluss auf die Tumorgenese, die Tumorsuppression, die Angiogenese und weitere tumorfördernde Signalwege. Das Krebssekretom fördert die Immunsuppression, die Therapieresistenz und die Metastasierung (Madden et al., 2020; Paltridge et al., 2013; Ritchie et al., 2021; Robinson et al., 2019). Aus diesem Grund werden Komponenten des Sekretoms intensiv als Biomarker und therapeutische Ziele evaluiert (Padgaonkar et al., 2023; Pavlou and Diamandis, 2010). Auch EVs modifizieren das Tumormikromilieu und fördern Tumorprogression, Angiogenese und Therapieresistenz und dienen als Biomarker (Urabe et al., 2020), da sie wichtige Botenstoffe wie Proteine, Nukleinsäuren und Lipide enthalten können, deren Zell-Zell-Transport eine besondere Form der interzellulären Kommunikation ermöglicht (van Niel et al., 2018).

Im Gegensatz zu dem codierenden Genom (im Mensch ca. 20.000 Gene) (Nurk et al., 2022) ist die genaue Dimension des sekretierten Proteoms unscharf definiert und für viele Konditionen weiterhin unbekannt. Neuere Publikationen annotieren anhand von bioinformatischen und experimentellen Daten ca. 6000- 7000 Proteine als sezernierbar (Chen et al., 2019; Uhlen et al., 2019).

Das Sekretom der Zelle kann auch als ein „Endpunkt“ der Genexpression aufgefasst werden. Die Genexpression ist ein sehr komplexer Prozess, welcher auf vielen Ebenen reguliert wird (Buccitelli and Selbach, 2020). Die Transkription von Genen wird beispielsweise durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B) aktiviert oder reprimiert (Pope and Medzhitov, 2018; Weidemuller et al., 2021). Auch die Prozessierung (Spleißen, Polyadenylierung und Modifikationen) der mRNA spielt eine wichtige Rolle auf dem Weg vom Gen zum funktionellen Protein (Bentley, 2014). Zudem wird der mRNA Export und die mRNA Stabilität durch RNA-bindende Proteine gesteuert (Buccitelli and Selbach, 2020; Hentze et al., 2018). Wurde die mRNA aus dem Kern exportiert, folgt die Translation. Die mRNA Sequenz wird am Ribosom zu einer Aminosäuresequenz übersetzt und eine Polypeptidkette entsteht. Auch hierbei handelt es sich um einen Prozess, welcher auf verschiedenen Ebenen stark regulierbar ist

(Berg et al., 2018; Proud, 2001). Anschließend sind vor allem posttranslationale Modifikationen für das Protein von großer Bedeutung, um beispielsweise die katalytische Aktivität zu steuern (Ramazi and Zahiri, 2021). Verschiedene zelluläre Prozesse haben zudem eine Degradation des Proteins zur Folge (Dikic, 2017).

Sekretierte Faktoren werden allgemein über verschiedene Wege von den Zellen abgegeben. Proteine, welche über den klassischen Sekretionsweg abgegeben werden, enthalten eine spezifische Signalsequenz für die Sekretion. Ca. 13 % der Proteine des gesamten Proteoms enthalten eine solche Signalsequenz (Uhlen et al., 2019). Proteine, welche diese N-terminale Signalsequenz besitzen, werden ko-translational in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transloziert. Im ER werden die Proteine gefaltet und glykosyliert. Die glykosylierten und richtig gefalteten Proteine werden anschließend über COPII Vesikel zum Golgi-Apparat (GA) transportiert. Dort werden die Zuckerketten weiter modifiziert. Die Prozessierung der Proteine wird abgeschlossen und sie erlangen ihre physiologische Konformation. Anschließend verlassen die Proteine in Vesikeln den trans-GA und werden zur Plasmamembran transportiert, wo die Proteine aus der Zelle ausgeschleust werden. Der klassische Sekretionsweg ist somit abhängig vom ER und vom GA (Bhattacharya et al., 2014; Lee et al., 2004; Viotti, 2016). Alternativ können Proteine über ER- und GA-unabhängige Wege, die sogenannten unkonventionellen Sekretionswege, sekretiert werden. Sowohl Proteine mit Signalsequenz als auch Proteine ohne Signalsequenz nutzen diese Wege. Vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems verwenden diese Art der Sekretion. Die Proteine werden entweder über Vesikel, Endosomen, Lysosomen, Poren oder über Transporter ausgeschleust (Bhattacharya et al., 2014; Ding et al., 2012; Jacopo, 2023; Kim et al., 2018; Nickel and Rabouille, 2009). IL-1 β ist beispielsweise ein Zytokin, welches keine Signalsequenz besitzt und somit den unkonventionellen Sekretionsweg nutzt. Die Inhibition des konventionellen Wegs hat keinen Einfluss auf die IL-1 β Sekretion. Während der Entzündungsreaktion wird Caspase-1 in sogenannten Inflammasomkomplexen aktiviert, welche pro-IL-1 β zu IL-1 β spalten. Dieses wird daraufhin in Lysosomen verpackt, welche mit der Plasmamembran fusionieren. Die Sekretion von IL-1 β wird durch Methylamin, welches die Endozytose blockiert, inhibiert. Außerdem sorgen niedrige Temperaturen und Serum-freies Medium für eine verringerte Sekretion von IL-1 β (Andrei et al., 2004; Auron et al., 1984; Keller et al., 2008; Rubartelli et al., 1990).

Diese Ausführungen zeigen, dass ein Protein viele Ebenen der Regulation durchläuft, bevor es sekretiert werden kann (Buccitelli and Selbach, 2020). In dieser Arbeit wurde das IL-1-NF- κ B System als Modell verwendet, um die Regulation der Genexpression bis hin zur Proteinsekretion auf mehreren Ebenen zu untersuchen (Abb. 1.7).

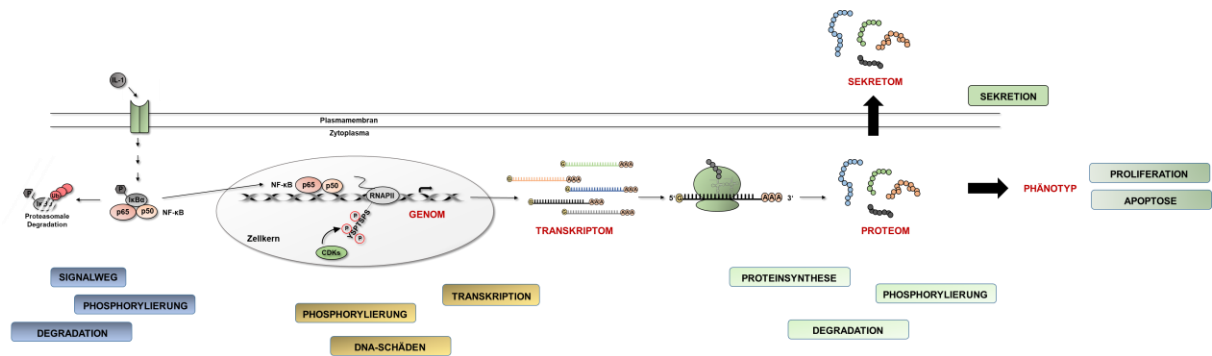


Abb. 1.7 Der Weg der Genexpression.

Die Genexpression bzw. die Proteinexpression werden in vielen miteinander verknüpften Schritten reguliert. In dieser Arbeit wurde das IL-1-NF-κB System als Modell verwendet, um diese Prozesse auf den Ebenen der Signaltransduktion, mRNA Synthese, Proteinexpression und Sekretion zu erfassen. Die dazu erhobenen Parameter sind als farbige Textboxen (blau, grün, gelb) dargestellt.

1.10 Zielsetzung

Unpublizierte, massenspektrometrische Analysen des Phosphoproteoms der AG Kracht zeigten, dass einige CDKs (CDK1, CDK2, CDK12 und CDK13) nach erfolgter IL-1 Stimulation von HeLa Zellen phosphoryliert werden. Die Inhibition von TAK1, einer *upstream* Komponente des IL-1 Signalwegs, verhinderte die IL-1 induzierte Phosphorylierung dieser CDKs, wodurch suggeriert wurde, dass diese CDKs *downstream* Effektoren des IL-1 Signalwegs sein könnten (Abb. 1.8). Aus diesem Grund war es von hohem Interesse, die Wechselwirkungen zwischen dem IL-1-NF-κB System und den CDKs näher zu untersuchen.

Protein	Phosphorylierungsstelle	Verhältnis											
		IL-1 vs unbehandelt						IL-1 + TAK vs IL-1					
		5	30	60	180	360	5	30	60	180	360	5	30
CDK1	161	3.5	3.6	5.2	5.5	4.7	0.8	1.0	-2.0	-1.8	0.0		
CDK2	159; 159	1.7	2.4	3.5	3.5	3.1	1.1	0.8	-1.1	-0.8	0.1		
CDK2	160; 160	1.7	2.4	3.5	3.5	3.1	1.1	0.8	-1.1	-0.8	0.1		
CDK10	196; 125; 125; 125	2.1	1.5	2.8	3.2	2.8	0.2	1.1	-0.6	-0.9	-0.1		
CDK11A	570; 580	1.2	1.3	2.1	2.2	1.9	0.6	0.8	-0.7	-0.5	0.1		
CDK11B	582; 537; 548; 580; 571; 326	2.5	2.0	4.0	4.2	3.6	0.0	1.4	-1.8	-1.6	0.2		
CDK12	514; 514	2.0	1.5	2.6	2.7	2.7	0.1	0.8	-0.5	-0.4	0.2		
CDK12	385; 385	1.4	0.9	2.0	2.0	1.7	0.4	0.9	-0.7	-0.6	0.0		
CDK12	681; 681	0.6	0.3	1.0	0.6	0.9	0.3	0.3	-0.5	0.2	-0.7		
CDK12	685; 685	0.6	0.3	1.0	0.6	0.9	0.3	0.3	-0.5	0.2	-0.7		
CDK13	1246; 1186	0.4	-0.4	1.0	1.4	1.1	-0.1	1.1	-0.7	-0.7	0.3		
CDK18	134; 164; 134	-0.1	1.0	1.1	1.2	0.4	1.4	0.0	0.0	0.2	1.2		
CDK15	529, 531, 533; 529, 531, 533	0.1	-0.5	-1.0	-0.6	-1.0	-0.9	-0.2	0.1	-0.2	0.8		
CDK7	170	1.0	0.4	0.4	0.2	0.1	-0.6	-0.4	-0.5	-0.9	-0.2		
CDK7	164	0.1	0.4	0.4	0.0	1.2	0.2	-0.2	-0.4	1.6	0.1		
CDK9	347	-0.2	-0.9	-0.2	-0.9	-0.5	-1.1	-0.6	-1.3	-1.3	0.4		
IL-1 [10 ng/ml] (min)		5	30	60	180	360	5	30	60	180	360		

Abb. 1.8 Massenspektrometrische Analyse des IL-1 induzierten Phosphoproteoms.

HeLa Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit IL-1 stimuliert. Einige der Zellen wurden vorab mit dem TAK1-Inhibitor (5Z-7-Oxozeaenol) behandelt. Anschließend wurde das Phosphoproteom massenspektrometrisch untersucht. Gezeigt sind die relativen Änderungen (im Vergleich zu unbehandelten Zellen) des Phosphorylierungsstatus verschiedener im LC-MS/MS identifizierter CDKs.

Ein primäres Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der funktionellen Rolle von verschiedenen CDKs im IL-1-NF-κB Signalweg und in der IL-1 induzierten Genexpression und Proteinsekretion mit einem speziellen Fokus auf CDK12 und CDK13, da deren spezifische Rolle in inflammatorischen Konditionen weitgehend unbekannt war (Abb. 1.9). Zum einen sollte der Einfluss der CDK Inhibition mittels der pharmakologischen Inhibitoren Flavopiridol

und THZ531 untersucht werden, welche die enzymatische Aktivität der unterschiedlichen Kinasen blockieren. Zum anderen sollte der Einfluss einer Depletion von CDK12 auf die IL-1 induzierte Genexpression und Proteinsekretion ermittelt werden. Hierfür wurde zum einen ein sogenannter PROTAC (*proteolysis targeting chimera*) verwendet, welcher die Degradation seines Zielproteins induziert. Zum anderen wurde ein genetisches System etabliert, welches eine spezifische und transiente Degradation von CDK12 über ein Auxin-induziertes Degron ermöglichte.

Neben der systematischen und vergleichenden Untersuchung der Effekte dieser Perturbationen auf das Transkriptom von IL-1-responsiven Tumorzellen, war die parallele Erfassung der IL-1 vermittelten Sekretion der Zellen in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Durch den IL-1-NF- κ B Signalweg vermittelte Sekretomänderungen können das Tumormikromilieu stark modulieren. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung einer Methode, welche eine unvoreingenommene Identifikation des Sekretoms erlaubt. Hierfür wurde eine auf der sogenannten KLINK Chemie basierende Methode etabliert und optimiert, die es erlaubt, neu-synthetisierte Proteine zu markieren, aufzureinigen und massenspektrometrisch (mittels LC-MS/MS - *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*) zu identifizieren und zu quantifizieren.

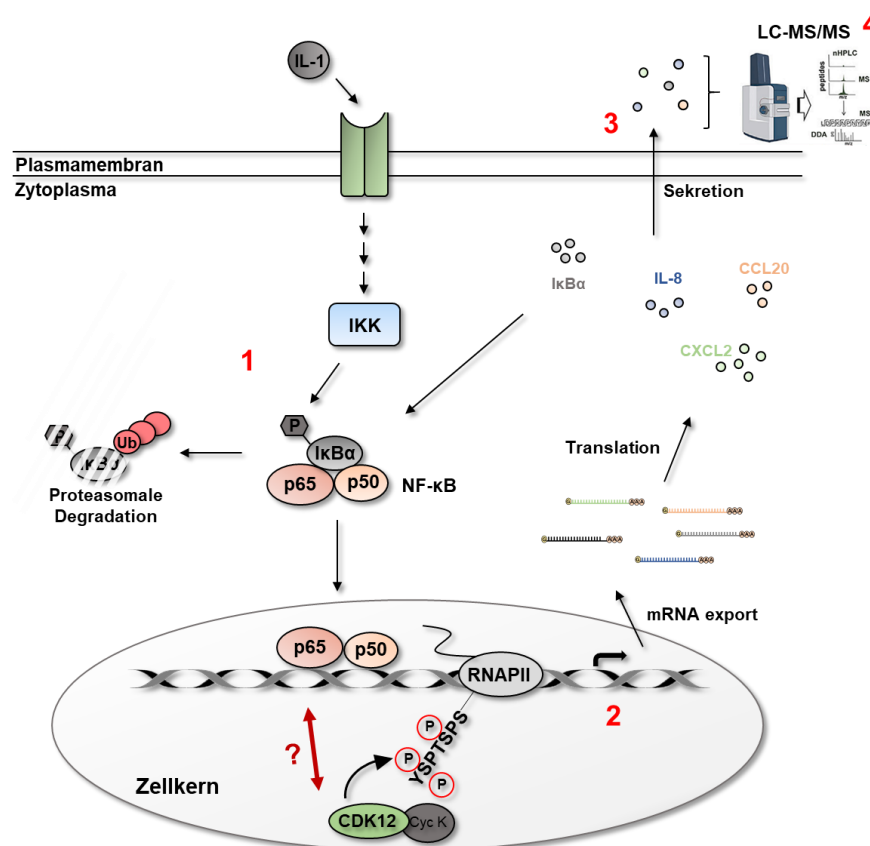


Abb. 1.9 Schematische Darstellung der Ziele (1 bis 4) dieser Arbeit zur Untersuchung des Zusammenspiels zwischen dem IL-1-NF- κ B Signalweg und verschiedenen Cyclin-abhängigen Kinasen bei der Zytokin-abhängigen mRNA Expression und Sekretion.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystem
Chemi Doc Touch Imaging System	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific
DynaMag™-2 Magnet	Invitrogen
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese Powersupply EPS 600	Pharmacia Biotech
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf
FACSCanto II	BD Bioscience
Gel iX Imager UV-Transilluminator	INTAS
Gelkammer	Thermo Scientific
Intellimixer RM-2L	ELMI
Kühl- und Gefrierschränke	Heraeus, Bosch, Thermo Scientific, Siemens
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Mikroskop DMI IRB	Leica
Mikroskop DMIL	Leica
Mikroskop DMI8	Leica
Multikanalpipette Xplorer Plus	Eppendorf
Multipipette stream	Eppendorf
Mupid-One electrophoresis system	Advance
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Pipetboy	Integra
Semi-Dry-Blotter	Peqlab Biotechnologie
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Sorvall RC6+ Zentrifuge	Thermo Scientific
SpectraMax Plus 384 Microplate-Reader	Molecular Devices
Thermocycler T Professional	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5427 R	Eppendorf
TJ-25 Zentrifuge	Beckman Coulter
Vortex Mixer	NeoLabLine
Waage MP-3000	Chyo
Wasserbad	GFL

2.2 Verbrauchsmaterialien

Die verschiedenen Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen applied biosystems, Biozym, Eppendorf, Greiner, Integra, nerbe plus, Roth und Sarstedt bezogen.

2.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma bezogen.

2.4 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Kit	Hersteller
Human CCL20/MIP-3 α DuoSet ELISA	R&D Systems (DY360)
Human CXCL2/GRO β DuoSet ELISA	R&D Systems (DY276)
Human ICAM-1/CD54 DuoSet ELISA	R&D Systems (DY720)
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems (DY206)
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	R&D Systems (DY208)
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel (#740574)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel (#740609)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (#740588)
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel (#740955)
NucleoSpin Tissue Kit	Macherey-Nagel (#740952)
Venor GeM Classic	Minerva Biolabs (#11-1100)

Reagenz / Material	Hersteller
2 N H ₂ SO ₄	Merck (1007311000)
5 ml Falcons mit Zellsieb für FACS	Corning (#352235)
96-Well F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate	Thermo Scientific (#442404)
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth (3029)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	AppliChem
ATP (1mM)	Thermo Scientific (#R0441)
Biotin-Azid	CaYman (Cay-13040)
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva (#35051)
DPBS	PAN Biotech (P04-36500)
DirectPCR Lysis Reagent	Viagen Biotech (302-C)
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Scientific (#RO611)
dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Scientific (#RO192)
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (RPN2106)
ELISA Substrat Reagents	R&D Systems (DY999)
Ethidiumbromid	Carl Roth (#2218.2)
Fast Digest Buffer (10x)	Thermo Scientific (#B64)
Fast SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (4385612)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific (#SM0331)
Green GoTaq Flexi Puffer (5x)	Promega (#M7801)
Hank's BSS (HBSS)	PAN Biotech (P04-32505)
High Capacity Streptavidin Agarose Resin	Thermo Scientific (#20361)
High PerFect	Qiagen (301705)
ibiTreat μ -Slide VI 0.4	Ibidi (#80606)
Immobilon Western Chemiluminescent	Millipore (WBKLS0500)
HRP Substrat	
Linear Polyethylenimin (PEI)	Polysciences (#23966-1)
Magermilchpulver	Sucofin
Methylenblau	Sigma-Aldrich (#M4259)
MgCl ₂ (25 mM)	Thermo Scientific (#R0971)
Mounting Medium	Ibidi (#50001)
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka BioChemika (#74385)
O-propargyl-puromycin (OPP)	MedChemExpress (HY-15680)
PageRuler™ PLUS Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (#26620)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (#26616)
4% Paraformaldehyde (in PBS)	Santa Cruz (sc-281692)
Pierce Detergent Comaptible Bradford	Thermo Scientific (#1863028)
Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads	Thermo Scientific (#88817)

PlasmidSafe Puffer (10x)	Lucigen (#E3101K)
Ponceau S	Serva (#33429)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (P4864)
Random Hexamer Primer	Thermo Scientific (S0142)
Reaction Buffer for RT (5x)	Thermo Scientific (EP0441)
Roti-Load Puffer (4x)	Carl Roth (#K929)
Roti-PVDF	Carl Roth (T830)
Roti-Quant	Carl Roth (#K015)
T4 Ligase Buffer (10x)	Fermentas (#B69)
T4 Polynukleotid Kinase (PNK) Puffer A	Thermo Scientific (#EK0031)
Taqman Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems (4352042)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma Life Science (T9281-25ML)
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Aldrich (A706-2G)
Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]amin) (TBTA)	Sigma (678937)
Trypsin/EDTA	PAN Biotech (P10-023100)
Whatman Gel Blot Paper	Whatman Gel Blot Paper
Zeba Spin Desalting Columns	Thermo Scientific (#89882)

2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (CIAP)	Fermentas (# EF0654)
Fast Digest BamHI	Thermo Scientific (FD0054)
Fast Digest Bpil	Thermo Scientific (FD1014)
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	Promega (#M7808)
PlasmidSafe DNase (10U/μl)	Lucigen (#E3101K)
Proteinase K	Viagen Biotech (501-PK)
RevertAid Reverse Transkriptase (200U/μl)	Thermo Scientific (EP0441)
RNaseA (10 mg/ml)	Thermo Scientific (EN0531)
T4 Ligase	Fermentas (# EL0011)
T4 Polynucleotid Kinase	Thermo Scientific (#EK0031)

2.6 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
BSJ-4-116	MedChem (HY-139039)
Cycloheximid	Merck Millipore (#239764)
Flavopiridol	Selleckchem (S1230)
Leupeptin Hemisulfat	Selleckchem (S7380)
Microcystin	Enzo Life Sciences (#ALX-350-012)
Pepstatin A	Applichem (#A2205)
PMSF	Sigma-Aldrich (P7626)
EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail	Roche (#11873580001)
SR-4835	MedChem (HY-130250)
THZ531	Selleckchem (S6595)

2.7 Expressionsvektoren

Bereits vorhandene und kommerzielle Vektoren:

Vektor	Herkunft
pX330 Leervektor	Addgene (#42230)
pMK286 mAID-Neo	Addgene (#72824)
pMK287 mAID-Hygro	Addgene (#72825)
pMK289 mAID-mClover-Neo	Addgene (#72827)
pMK290 mAID-mClover-Hygro	Addgene (#72828)
pUC57-Kan_CDK12_HAs	Biocat

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren:

Vektor	Herkunft
pX330_sg1_CDK12_Stop	Jasmin Priester
pX330_sg2_CDK12_Stop	Jasmin Priester
pUC57-Kan_CDK12_HAs_mAID-Neo	Jasmin Priester
pUC57-Kan_CDK12_HAs_mAID-Hygro	Jasmin Priester
pUC57-Kan_CDK12_HAs_mAID-mClover-Neo	Jasmin Priester
pUC57-Kan_CDK12_HAs_mAID-mClover-Hygro	Jasmin Priester

2.8 Oligonukleotide

2.8.1 Primer für qPCR

Alle Primer wurden von Eurofins Genomics bezogen

Oligonukleotid/Primer	Sequenz (5'-3'-Sequenz)
BIRC3_mRNA_se	CCAAGTGGTTTCCAAGGTGT
BIRC3_mRNA_as	TTTTCATCTCCTGGGCTGTC
CDK12_mRNA_se	AGTCCACTCCCCAGTAGGAA
CDK12_mRNA_as	ACAGGTGAACCCTTGGACTC
CDK13_mRNA_se	CTTCGAAACCGTTGGGAGGA
CDK13_mRNA_as	GGTCATCTTGTCCCGACACC
OsTIR1_mRNA_se	GTGGCCGGATATAGTGCTGT
OsTIR1_mRNA_as	TGGAGTCCCTTGCACTCTCT

2.8.2 Primer zur Genotypisierung und Sanger-Sequenzierung

Oligonukleotid/Primer	Sequenz (5'-3'-Sequenz)
13_Hygro_se	GGACCGATGGCTGTGTAGAA
14_Neo_se	ACCGCTTCCTCGTGCTTTAC
2_mAID_as	TTGATTTTTTGGCAGGAAACC
3_mClover_as	GAACCTTCAGGGTCAGCTTGC
5_Hygro_se	GAATTCAGCGAGAGCCTGAC
6_Hygro_as	GATGTTGGCGACCTCGTATT
7_Neo_se	AGACAATCGGCTGCTCTGAT
8_Neo_as	ATACTTTCTCGGCAGGAGCA
CDK12_WT_as	CAGCAATGTCCAAGCTGTCC
CDK12_WT_se	CTGCCTTGGCAGGAGTTCATTA
M13-24F	CCAGGGTTTTCCCAAGTCACG
M13-24R	CGGATAACAATTTACACAGG
pX459_sgRNA_Seq	GCATATACGATACAAGGCTG

2.8.3 Oligonukleotide für Klonierungen

sgRNA	Sequenz
sgRNA1_CDK12_Stop_se	CACCGCTGAAGTCTCTGGGTTAGTA
sgRNA1_CDK12_Stop_as	AAACTACTAACCCAGAGACTTCAGC
sgRNA2_CDK12_Stop_se	CACCGTTCAGGACACTGAAGTCTCT
sgRNA2_CDK12_Stop_as	AAACAGAGACTTCAGTGTCTCCTGAAC

2.8.4 Oligonukleotide für den RNAi-vermittelten *knockdown*

siRNA	Produktname	Zielsequenz (5'-3')	Hersteller
siLuci	LuciGL2siRNA	CGUACGCGGAUACUUCGA	Eurofins Genomics (027461943)
siCDK13_1	Hs_CDC2L5_6	TCAGAGTATTATCAATATGAA	Qiagen (SI02621976)
siCDK13_2	Hs_CDC2L5_5	ACCGACGTAGTTTCATTGGGAA	Qiagen (SI02621969)
siCDK13_3	Hs_CDC2L5_12	CAGCCGGACTAAGTCGTCCAA	Qiagen (SI04899321)
siCDK13_4	Hs_CDC2L5_10	TCGATTGTATAGCTCAGAAGA	Qiagen (SI02631755)

2.9 Taqman Assays on Demand

Taqman Assays on Demand (Applied Biosystems)

Sonde	Produktgröße [bp]	RefSeq	Assay-ID
ACTB	171	NM_001101.3	Hs999999903_m1
CCL2	101	NM_002982.3	Hs00234140_m1
CCL20	96	NM_004591.2	Hs01011368_m1
CXCL2	68	NM_002089.3	Hs00236966_m1
CXCL8/IL8	101	NM_000584.3	Hs00174103_m1
ICAM1	99	NM_000201.2	Hs999999152_m1
IL6	95	NM_000600.4	Hs00174131_m1
NFkBIA	68	NM_020529.2	Hs00153283_m1
TNFAIP3	63	NM_006290.3	Hs00234713_m1

2.10 Antikörper

2.10.1 Primärantikörper für Western Blot

Alle Primärantikörper zzgl. 0,02% NaN₃

Mit * gekennzeichnete Primärantikörper zzgl. 50 mM NaF

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
α-A20	Santa Cruz (sc-166692)	1:500 in TBS-T mit 5% BSA
α-Actinin	Sigma Aldrich (A5044)	1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
α-CDK13	EMD Millipore (ABE1860)	1:1000 in TBS-T in 5% Milch
α-c-PARP	Santa Cruz (sc-56196)	1:1000 in TBS-T mit 5% Milch

α -CrkRS (CDK12)	Novus (NB100-87011)	1:1000 in TBS-T in 5% Milch
α -IKK α	Santa Cruz (sc-7218)	1:500 in TBS-T mit 5% Milch
α -IKK β	Santa Cruz (sc-7330)	1:500 in TBS-T (0,1% Tween) mit 5% BSA
α -IKK γ	Santa Cruz (sc-8330)	1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
α -I κ B α	Cell Signaling (#9242)	1:1000 in TBS-T mit 5% BSA
α -OsTIR1 (rb)	MBL (PD048)	1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
α -p(S2)-Pol II (rb)	abcam (ab5095)	1:10.000 in TBS-T mit 5% Milch
α -p(S32)-I κ B α	Cell Signaling (#2859)	1:1000 in TBS-T mit 5% BSA *
α -p(S5)-Pol II (rb)	abcam (ab5131)	1:10.000 in TBS-T mit 5% Milch
α -p(S536)-p65 (rb)	Cell Signaling (#3033)	1:1000 in TBS-T mit 5% BSA *
α -p(SS176/180)-IKK α/β	Cell Signaling (#2697)	1:1000 in TBS-T (0,1% Tween) mit 5% BSA
α -p65/NF κ B (C-20) (rb)	Santa Cruz (sc-372)	1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
α -p65/NF κ B (ms)	Santa Cruz (sc-8008)	1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
α -Pol II (ms)	Millipore (#17-620)	1:10.000 in TBS-T mit 5% Milch
α -pp(S807/811)-RB	Cell Signaling (#9308)	1:1000 in TBS-T (0,1% Tween) mit 5% BSA *
α -pp(T184/7)-TAK1	Cell Signaling (#4508)	1:1000 in TBS-T (0,1% Tween) mit 5% Milch *
α -TAK1	Cell Signaling (#4505)	1:1000 in TBS-T mit 5% BSA
α - β -Actin (C4) (ms)	Santa Cruz (sc-47778)	1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
α - γ H2AX	Abcam (11174)	1:1000 in TBS-T

2.10.2 Sekundärantikörper für Western Blot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
goat- α -mouse (HRP)	Dako P0447	1:2000 – 1:3000 in 5 % Milch in TBST
goat- α -rabbit (HRP)	Dako P0448	1:10.000 für α - β -Actin 1:2000 – 1:3000 in 5 % Milch in TBST
Für die Detektion biotinylierter Proteine verwendet:		
Streptavidin-HRP	PerkinElmer (NEL750001EA)	1:5000 in 5 % BSA in TBS-T

2.11 Puffer und Lösungen

Puffer wurden, sofern nicht anders vermerkt, in ddH₂O angesetzt.

2.11.1 Puffer für Zelllyse

Puffer	Zusammensetzung
Puffer für Gesamtzellextrakt (Spezial-Lyse-Puffer)	30 mM Natriumpyrophosphat 50 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 2 mM Na ₃ VO ₄ 50 mM NaF 20 mM β -Glycerophosphat 10 mM Tris (pH 7,05 mit HCl)

Vor der Verwendung frisch hinzugeben:
 2,5 µg/ml Leupeptid
 1 µM Microcystin
 1 µg/ml Pepstatin
 0.5 mM PMSF

2.11.2 Puffer für SDS-PAGE, Silberfärbung und Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1.92 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8 in HCl
Trenngelpuffer	1 M Tris pH 8,8 in HCl
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	235 mmol/l Natriumcarbonat 0.01 % Formaldehyd
Färbelösung (Silberfärbung)	6 mmol/l Silbernitrat 0.05 % Formaldehyd
Fixierlösung (Silberfärbung)	12.5 % w/v TCA in ddH ₂ O
Inkubationslösung (Silberfärbung)	500 mmol/l Natriumacetat 20 mmol/l Natriumthiosulfat 2 % Glutaraldehyd
Stopp-Lösung (Silberfärbung)	5 % Essigsäure
Blocklösung	5 % Milchpulver in TBS-T
Blotpuffer für Western Blot (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 20 % (v/v) Methanol
Coomassie-Entfärbelösung	30 % Methanol 1 % Ameisensäure
Coomassie-Lösung	0.167 % Coomassie Blue 16.67 % Methanol 33.33 % Ameisensäure
Ponceau S-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure

Material

TBS (10x)	100 mM Tris 1.5 M NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen
TBS-T	0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS (1x) mit HCl auf pH 7,4 einstellen

2.11.3 Puffer für Agarosegelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
TAE (10x)	1,1 % (v/v) Essigsäure 10 mM EDTA 200 mM Tris

2.11.4 Puffer für ELISA

Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer (frisch ansetzen)	1 % BSA in DPBS
<i>Reagent Diluent</i> (frisch ansetzen)	0,1 % BSA 0,05 % Tween 20 in TBS
Stopp-Lösung	2 N H ₂ SO ₄
TBS	10 mM Tris 150 mM NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in DPBS

2.11.5 Puffer für die KCLICK Reaktion

Puffer	Zusammensetzung
KCLICK Chemie Lyse-Puffer	100 mM Hepes (pH 7.5) 150 mM NaCl 1 % NP-40
Waschpuffer I	1 % NP-40 0,1 % SDS in DPBS
Waschpuffer II	6 M Harnstoff in DPBS
MS-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 2 mM CaCl ₂

2.12 Medien und Zusätze für Zellkulturen und Bakterienkulturen

2.12.1 Medien und Zusätze

Medium/Zusatz	Hersteller
DMEM	Pan Biotech (P04-03550)
DMEM Met-frei	Gibco (#2337023)
DMEM/F-12 (1:1)(1x)	Gibco (#2026809)
RPMI-1640	Pan Biotech (P04-17500)
FBS Good Forte	Pan Biotech (P40-47500)
FBS (tet-frei)	Pan Biotech (P30-3602)
Standard I-Nähragar	Merck (#1.07881.0500)
Penicillin//Streptomycin	Pan Biotech (P06-07050)
L-Glutamin	Pan Biotech P04-80100)
OptiMEM	Thermo Scientific (#51985026)

Medium	Zusammensetzung
DMEM Vollmedium (Dulbecco's modified Eagle's medium)	DMEM 10 % (v/v) FBS (optional tet-freies FBS) 20 µg/ml Streptomycin 20 U/ml Penicillin 2 mM L-Glutamin
DMEM Methionin-frei für L-HPG-labeling	DMEM Met-frei 100 mM L-Cystein 20 µg/ml Streptomycin 20 U/ml Penicillin 6 mM L-Glutamin
RPMI-1640 Vollmedium	RPMI-1640 10 % (v/v) FBS (optional tet-freies FBS) 20 µg/ml Streptomycin 20 U/ml Penicillin 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium	DMEM-Vollmedium 10 % FBS 10 % DMSO
LB-Medium	10 g BactoTrypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt add. 1l ddH ₂ O autoklavieren
LB-Platten	18,5 g Standard I-Nähragar add. 0.5 l ddH ₂ O autoklavieren

2.12.2 Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	Carl Roth (#HP62.1)
Doxycyclin	1 µg/ml	Sigma-Aldrich (#D9891)
Geneticin Sulfate G418 (Neo)	700 µg/ml	Gibco (#10131035)
Hygromycin B Gold (Hygro)	100 µg/ml	InvivoGen (#ant-hg-1)
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml	Carl Roth (#T832.2)
Penicillin//Streptomycin	20 U/ml // 20 µg/ml	Pan Biotech (P06-07050)
Puromycin (Puro)	25 µM	InvivoGen (#ant-pr-1)

2.12.3 Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Endkonzentration	Herkunft
humanes, rekombinantes IL-1α	10 ng/ml	AG Kracht

2.12.4 Stimulanzen

Stimulanz	Endkonzentration	Herkunft
Auxin/ IAA	250 µM	Sigma (#13750)
L-Homopropargylglycin (L-HPG)	25 µM	Jena Bioscience (CLK-1067-25)

2.13 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HCT116 (humane epitheloide Colonkarzinomzellen)	ATCC
HCT116 tet-OsTIR1	Natsume et al., 2016 AG Schmitz
HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID	In dieser Arbeit generiert
HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover	In dieser Arbeit generiert
HeLa (humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen)	ATCC
iFTSEC (immortalisierte, sekretorische Epithelzellen vom Eileiter)	Applied Biological Materials AG Schmitz
iFTSEC + empty vector (stabil transfizierte iFTSEC)	AG Schmitz
iFTSEC + mutKRAS/c-Myc (stabil transfizierte, transformierte iFTSEC)	Karst and Drapkin et al. 2012 AG Schmitz
OVCAR-4 (humane, ovariale Adenokarzinomzellen)	AG Pogge

2.14 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
One Shot™ TOP10 chemisch kompetente <i>E.coli</i> (Thermo Scientific #C404010)	F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
XL1-Blue <i>E.coli</i> (Invitrogen)	F' Tn10(Tetr) proA +B + lacIqΔ(lacZ)M15I recA1 gyrA96 (Nalr) tbi-1bsdR17 (r-k m-k) glnV44 relA1 lac

2.15 Software Programme

Software	Version / Link
7500 Software Applied Biosystems	Version 1.4
BioRad Image Lab	Version 6.0.1
ChopChop	https://chopchop.cbu.uib.no/
DNA Star	Version 11.0.0.164
Endnote20	Version 20.0.0.14672
Graph Pad Prism 9	Version 9.5.0
Metascape	https://metascape.org/gp/index.html#/main/ (Zhou et al., 2019)
Mircosoft Office 2016	Professional Plus 2016
Morpheus	https://software.broadinstitute.org/morpheus/
Perseus	Version 1.6.15.0 (Tyanova and Cox, 2018)
Venn Diagram Plotter	https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Transformation von Bakterien (*E.coli* Top10 oder XL-1 Blue)

Um Plasmid-DNA bakteriell zu amplifizieren, wurden die chemisch kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden diese mit 150 ng Plasmid-DNA oder 2 µl Ligationsansatz vermischt. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 20 min. Daraufhin wurde ein Hitzeschock bei 45 °C für 45 s durchgeführt. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 min wurden die Bakterien mit 600 µl warmen LB-Medium versetzt. Die Bakteriensuspension wurde für 1 h bei 37 °C und 900 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 580 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Daraufhin wurden 15 µl des Transformationsansatzes auf warmen Selektions-Agarplatten (zzgl. Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml)) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.1.2 Kultivierung von Bakterien

Nach erfolgreicher Transformation (siehe 3.1.1) wurden einzelne gewachsene Bakterienkolonien gepickt und kultiviert. Dafür wurden 5 ml warmes LB-Medium (zzgl. entsprechendem Antibiotikum) in Inkubationsröhrchen vorgelegt. Anschließend wurden einzelne Klone gepickt und in das LB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte für 16 – 18 h bei 37° C und 220 rpm. Am darauffolgenden Tag wurden 2 ml der Bakteriensuspension eingesetzt, um die Plasmid-DNA zu isolieren (Mini-Präp).

Alternativ wurde die gesamte Vorkultur nach der Transformation direkt mit 150 ml LB-Medium (zzgl. entsprechendem Antibiotikum) in einen Schikanekolben überführt und ebenfalls über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert (Maxi-Präp).

3.1.3 Lagerung von Bakteriensuspensionen

Bakteriensuspensionen wurden langfristig gelagert. Dafür wurde 750 µl Bakteriensuspension mit 750 µl Glycerol versetzt (1:1). Der Stock wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C dauerhaft gelagert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurde bei 500 xg für 5 min zentrifugiert und anschließend in frischem Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine frische Zellkulturschale überführt, in welche bereits Vollmedium

vorgelegt wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C und 6 % CO₂ kultiviert. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zweimal mit warmen DPBS gewaschen. Die Kultivierung erfolgte weiterhin bei 37 °C und 6 % CO₂.

Zum Einfrieren wurden Zellen verwendet, welche 80-90 % konfluent gewachsen waren. Vor dem Einfrieren der Zellen wurden zunächst 100 µl des Zellkulturüberstands entnommen. Dieser wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 15 sek auf höchster Stufe zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Mycoplasmentestung bei –20 °C gelagert. Mittels Venor GeM Classic Kit von Minerva Biolabs wurde der Zellkulturüberstand nach Herstellerangaben auf Mycoplasmen getestet.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zweimal mit warmem DBPS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin/ETDA von der Zellkulturschale gelöst. Hierbei wurde das Trypsin/EDTA nach der vollständigen Benetzung der Zellen wieder abgenommen. Nach einer Inkubation der Zellen bei 37 °C und 6 % CO₂ für 2-3 min wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden vorübergehend in einer Styroporbox bei -80 °C gelagert. War der PCR-basierte Mycoplasmentest negativ, wurden die Kryostocks in flüssigen Stickstoff überführt und dort langfristig gelagert.

3.2.2 Kultivierung und Aussaat von Zellen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich adhärente Zelllinien verwendet, welche stets bei 37 °C und 6 % CO₂ kultiviert wurden. Je nach Wachstum der Zellen wurden diese in regelmäßigen Abständen (alle 2-4 Tage) passagiert oder entsprechend für unterschiedliche Versuchsansätze ausgesät. Dafür wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst. Hatten sich die Zellen vollständig abgelöst, wurden sie in Vollmedium resuspendiert. Um die Zellzahl genau zu bestimmen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Es wurden jeweils vier Großquadrate gezählt, um die vorhandene Zellkonzentration genau bestimmen zu können:

$$(\sum \text{Zellzahl der vier Großquadrate}/4) * 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

Anschließend wurde eine geeignete Menge der Zellsuspension bzw. eine bestimmte Zellanzahl in eine neue Zellkulturschale mit Vollmedium überführt. Die verschiedenen Zelllinien wurden in folgenden Medien kultiviert:

Zelllinie	Medium
HCT116 parental	DMEM
HCT116 tet-OsTIR1	DMEM (tet-freies FBS)
HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover	DMEM (tet-freies FBS)
HeLa parental	DMEM
OVCAR-4	RPMI-1640
iFTSECs	DMEM/F-12 (1:1)(1x)
iFTSEC+Leervektor	DMEM/F-12 (1:1)(1x)
iFTSECs+mutKRAS/Myc	DMEM/F-12 (1:1)(1x)

3.2.3 Behandlung/Stimulation von Zellen

Um die Einflüsse verschiedener Behandlungen auf den IL-1 Signalweg zu untersuchen, wurden Zellen je nach Versuchsbedingung für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α stimuliert. Dafür wurde die entsprechende Menge des Zytokins direkt in das Medium der Zellen gegeben. Sollten die Einflüsse der CDK Inhibition durch Flavopiridol oder THZ531 untersucht werden, wurden die Inhibitoren 1 h vor der IL-1 Stimulation in das Zellkulturmedium pipettiert. Wurde wiederum der Effekt des PROTACs BSJ-4-116 untersucht, so wurden die Zellen für insgesamt 24 h mit diesem behandelt. Als Kontrolle dienten Behandlungen der Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. unbehandelte Zellen.

Als weitere Möglichkeit der Untersuchung des Einflusses der CDK12 Degradation diene das Auxin-induzierte Degron System. Um die CDK12 Degradation zu induzieren, wurden die monoklonalen Degron-Zellen für insgesamt 24 h mit Doxycyclin und Auxin inkubiert. Auch diese Komponenten wurden dem Zellkulturmedium als geeignete Verdünnung zugesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Lösungsmittel EtOH behandelt.

Folgende Konzentrationen der einzelnen Stimulanzien/Inhibitoren wurden verwendet:

	Stockkonzentration	Endkonzentration
IL-1	10 μ g/ml	10 ng/ml
Flavopiridol	10 mM	10 μ M
THZ531	10 mM	1 μ M
BSJ-4-116	10 mM	500 nM, 250 nM, 100 nM
Doxycyclin	1 mg/ml	1 μ g/ml
Auxin	250 mM	250 μ M

Vor jeder Behandlung/Stimulation wurde das Medium in den unterschiedlichen Zellkulturschalen auf ein identisches Volumen eingestellt. Nach den Behandlungen wurden die Zellen weiterhin bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

3.2.4 Ernte der Zellen und Zellkulturüberstände

Nach erfolgter Behandlung der Zellen wurden diese für anschließende Analysen geerntet. Dafür wurden die Zellen auf Eis gestellt und anschließend zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurde erneut 1 ml DPBS auf die Zellen gegeben, um diese mittels Zellschabers mechanisch von der Zellkulturschale zu lösen. Die Zellsuspension wurde in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Analyse wurden die Pellets bei -80 °C gelagert. Alternativ konnten die Pellets auch direkt weiterverarbeitet werden.

Für Sekretomanalysen wurden zusätzlich die Zellkulturüberstände der Zellen geerntet. Dafür wurden diese in 15 ml Falcons überführt und bei 4 °C und 3000 x g für 5 min zentrifugiert. Dies diente der Entfernung von Zelltrümmern. Anschließend wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Analyse wurden die Zellkulturüberstände bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Transfektion mittels linearem Polyethylenimin (PEI)

Lineares Polyethylenimin (PEI) und die Plasmid-DNA bilden einen Komplex, welcher von den Zellen aufgenommen werden kann. Für die Transfektion wurden Zellen in 6-Well Mikrotiterplatten ausgesät. Für jeden Transfektionsansatz wurden 100 µl Opti-MEM und 6 µl des PEI-Stocks [1 mg/ml] zusammengegeben. Außerdem wurden insgesamt 2.5 µg Plasmid-DNA hinzugefügt. In dieser Arbeit wurden zur Etablierung des Auxin-induzierten Degron Systems jeweils 0.75 µg der beiden Donorvektoren (pUC57-Kan_CDK12_mAID Neo & pUC57-Kan_CDK12_mAID Hygro **oder** pUC57-Kan_CDK12_mAID-mClover Neo & pUC57-Kan_CDK12_mAID-mClover Hygro) und 1 µg des pX330 Vektors, welcher eine sgRNA enthielt, eingesetzt (pX330_sgRNA1_CDK12 oder pX330_sgRNA2_CDK12). Die Transfektionsansätze wurden gevortext und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 1900 µl DMEM (mit 10 % FBS aber ohne PSG) hinzugegeben. Die Ansätze wurden erneut gevortext. Das Medium der Zellen wurde vollständig entfernt und durch den jeweiligen Transfektionsansatz ersetzt. Die Inkubation erfolgte bis zum nächsten Tag bei 37 °C und 6% CO₂.

3.2.6 Transiente Transfektion mit HiPerfect

Bei HiPerfect handelt es sich um eine Mischung aus neutralen und kationischen Lipiden. Diese ermöglichen eine effektive Aufnahme von siRNAs in die Zelle. Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium aller Schalen einheitlich auf 3 ml eingestellt. Für die Transfektion wurden 250 µl Opti-MEM, 20 µl HiPerfect und insgesamt 20 nM siRNA zusammengegeben. Der Transfektionsansatz wurde gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6 h oder 24 h Inkubation wurden die Zellen zweimal mit warmem DPBS gewaschen und anschließend in Vollmedium kultiviert. Nach der Etablierung der Bedingungen wurden die Zellen ausschließlich für 24 h mit dem Transfektionsansatz inkubiert.

3.2.7 Generierung und Charakterisierung von monoklonalen Zelllinien

Für die Generierung von monoklonalen Zelllinien wurden Zellen mittels linear PEI transfiziert (siehe 3.2.5). Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen passagiert (1:15). Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium durch Selektionsmedium ersetzt, welches die

entsprechenden Selektionsantibiotika enthielt (700 µg/ml Geneticin Sulfate G418 und 100 µg/ml Hygromycin B Gold). Anschließend wurden die Zellen für insgesamt 4 Wochen dauerselektiert. Dafür wurde das Selektionsmedium alle 2-3 Tage gewechselt. Nach Bedarf wurden die Zellen passagiert und am Folgetag wieder mit Selektionsmedium kultiviert. Um monoklonale Zelllinien zu erhalten, wurden nach der erfolgten Dauerselektion 100 Zellen in 100 mm Schalen ausgesät. Nach 12 Tagen waren einzelne Kolonien mit bloßem Auge auf der Schalenunterseite erkennbar. Mit einem Stift wurden die Kolonien an der Zellkulturschale markiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem DPBS gewaschen. Mittels Trypsin/EDTA wurden die Zellen von der Zellkulturschale gelöst. Dafür wurden die Zellen vollständig mit Trypsin/EDTA benetzt und dieses wurde daraufhin vollständig abgesaugt. Es erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C und 6% CO₂ für 2-3 min. Wichtig war es, die Zellkulturschale nicht abzuklopfen, wie normalerweise üblich. Es wurde lediglich unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen von der Zellkulturschale gelöst hatten. Unter der Sterilbank wurden nun sterile Wattestäbchen oder gelbe Pipettenspitzen verwendet, um die Monoklone zu picken. Die Monoklone wurden in eine 96-Well Platte überführt und dort mit 100 µl Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 6% CO₂ kultiviert. Waren die Zellen konfluent, wurde die 96-Well Platte dupliziert. Nach einer weiteren Kultivierung für 2-3 Tage wurden die Zellen einer 96-Well Platte eingefroren (siehe 3.2.1). Die Zellen der zweiten 96-Well Platte wurden für eine erste Genotypisierung verwendet. Dafür wurde das Medium aller Zellen entfernt und die Zellen zweimal mit 100 µl DBPS gewaschen. Anschließend wurden 75 µl Direct PCR Lösung auf die Zellen gegeben (0.5 x DirectPCR Lysis Reagent (1:1 mit ddH₂O) mit 0.5 mg/ml Proteinase K). Die Platte wurde verschlossen und für 6 h bei 55 °C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde die 96-Well Platte nochmals für 1.5 h bei 85 °C inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren (Yesbolatova et al., 2019). Für die Genotypisierung wurde 1 µl des jeweiligen Lysats für die GoTaq-PCR eingesetzt. Die Analyse erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.4.8). Waren die Ergebnisse der Genotypisierung positiv, wurden die jeweiligen Monoklone in 24-Well Platten aufgetaut und schließlich expandiert.

3.2.8 Propidium-Iodid Färbung und Durchflussszytometrie

Um eine Aussage über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus treffen zu können, kann eine Propidium-Iodid (PI) Färbung vorgenommen werden. PI ist ein fluoreszierender DNA-Interkalator. Durch Bestimmung der Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflussszytometer können Aussagen über die DNA-Menge und somit über den Status der Zellen im Zellzyklus getroffen werden.

Die Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und nach erfolgter Behandlung geerntet. Dafür wurden die Zellkulturüberstände in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DBPS gewaschen. Das entnommene DBPS

wurde ebenfalls in die 15 ml Falcons überführt. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und in Vollmedium resuspendiert. Die Zellesuspension wurde ebenfalls zu dem Zellkulturüberstand in die Falcons überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 500 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml DBPS resuspendiert und erneut bei 500 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet zur Fixierung in 2 ml eiskaltem 70 % EtOH resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bis zur Messung bei -20 °C für höchstens 10 Tage. Für die Messung wurden die Zellen erneut bei 800 xg für 8 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 333 µl PBS + 1 µl RNase A resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden durch das Zellsieb in die 5 ml Falcons (spezielle Falcons für die Durchflusszytometrie) überführt. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h auf Eis. Daraufhin wurden 167 µl PI (Stock 50 µg/ml) hinzugegeben. Bis zur Messung wurden die Zellen im Dunkeln und auf Eis gelagert.

Während der Messung wurden 10.000 Zellen analysiert. Zellgröße und Granularität wurden im SSC (sideward scatter) / FSC (forward scatter) Plot visualisiert. Zellduplets wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Für die Messung der PI-Signale wurde der PE-Kanal (Phycoerythrin) verwendet und Histogramme wurden erstellt. Die Verteilung der Zellen im Zellzyklus wurde daraufhin quantifiziert.

3.2.9 Zellviabilitäts-Assay (MTS-Assay)

Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät, um einen sogenannten MTS-Assay durchzuführen. Dieser gibt Auskunft über die Viabilität der Zellen bzw. die Proliferation. MTS wird von metabolisch aktiven Zellen zu dem roten Farbstoff Formazan umgesetzt (Cory et al., 1991). Vermutlich wird diese Reaktion von NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen katalysiert. Nach erfolgter Behandlung wurden zu 100 µl Zellkulturmedium 5 µl Celltiter 96 One Solution Reagent gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen für 1 h bei 37 °C und 6% CO₂. Die Absorption wurde daraufhin bei 490 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Hintergrundabsorption des Mediums gemessen, um diese von allen gemessenen Werten abzuziehen.

3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen in µ-Slides (Ibidi) ausgesät. Nach erfolgter Behandlung wurde das Medium der Zellen entfernt und die Zellen innerhalb von 5 min dreimal mit 150 µl HBSS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 100 µl 4% Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Zellen zweimal für 5 min mit 150 µl HBSS gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl Mounting Medium eingedeckt und über Nacht bei RT gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen mikroskopiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Zell-Lyse

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde eine sogenannte „Spezial-Lyse“ durchgeführt. Hierfür wurde auf Eis gearbeitet. Die geernteten Zellpellets wurden entweder nach der Ernte direkt weiterverarbeitet oder auf Eis aufgetaut. Die PBS-Pellets wurden in einer geeigneten Menge Spezial-Lysepuffer resuspendiert und gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 15 min, gefolgt von einer Zentrifugation bei 4 °C und 10,400 xg für 15 min. Der Überstand enthielt das Spezial-Lysat. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene Proteinkonzentration mittels Bradford-Messung bestimmt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Zell-Lysaten wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Diese basiert auf dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Bei Bindung des Farbstoffes an Aminosäuren verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm (Bradford, 1976).

Für die Bestimmung der Proteinmenge wurden je 100 µl einer BSA-Standardreihe (5 µg/ml bis 35 µg/ml in PBS) in Drei- oder Vierfachwerten in einer 96-Well Platte vorgelegt. Des Weiteren wurden je 100 µl der Zell-Lysate, welche vorher in PBS verdünnt wurden (1:300), in die Vertiefungen der 96-Well Platte gegeben (ebenfalls mindestens Dreifachwerte). Anschließend wurden 100 µl des Bradford-Reagenz (40 % Roti-Quant) zu den Proben und der Eichreihe gegeben. Nach 5 min und kurzem Schütteln der Platte wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden vom Messgerät anhand der Eichreihe und des Verdünnungsfaktors berechnet. Anhand der Proteinkonzentrationen konnten die Proben für anschließende Analysen auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt werden.

3.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli

Bei der SDS-Page werden Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Bei Natriumdodecylsulfat (SDS) handelt es sich um ein anionisches (negativ geladenes) Detergenz, welches sich an Proteine anlagert und diese denaturiert. In einem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode, wobei kleine Proteine die Gelmatrix schneller durchqueren als große Proteine.

Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden in dieser Arbeit 6-12.5 %ige Trenngele verwendet. Im Trenngel wurden die Proteine in einem basischen pH nach ihrer Größe aufgetrennt. Bevor die Proteine das Trenngel passierten, wurden sie stets in einem 5 %igen Sammelgel mit neutralem pH gesammelt.

Lösung	6 % Trenngel [ml]	8 % Trenngel [ml]	12.5 % Trenngel [ml]	5 % Sammelgel [ml]
ddH ₂ O	7.4	5.6	1.6	5.61
50 % (v/v) Glycerol	2.4	2.4	2.4	0.9
Trenngelpuffer	10.3	10.3	10.3	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1.26
30 % (w/v) Polyacrylamid	5.4	7.2	11.3	1.68
2 % (w/v) SDS	1.35	1.35	1.35	0.5
40 % (w/v) APS	0.041	0.041	0.041	0.03
TEMED	0.027	0.027	0.027	0.02

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel vorbereitet. War auch dieses polymerisiert, konnte die Laufkammer mit 1x Laemmli-Laufpuffer befüllt und die Proben aufgetragen werden. Mittels der Bradford-Methode (siehe 3.3.2) wurden die Proben vorher auf eine einheitliche Proteinmenge (25 -60 µg) eingestellt. Außerdem wurden die Proben mit 1 x Roti-Load Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Um schließlich eine Aussage über das Molekulargewicht der Proteine treffen zu können, wurde zudem ein Molmassen-Standard aufgetragen. Nachdem das Gel beladen wurde, erfolgte die Trennung der Proteine bei 50 mA für 2.5 h.

3.3.4 Silberfärbung von SDS-Gelen

Mittels Silberfärbung können Proteine im SDS-Gel nach deren Auftrennung angefärbt werden. Dadurch können Rückschlüsse über die Gesamtproteinmenge einzelner Proben gezogen werden. Für die Färbung wurde das Gel nach der SDS-Page über Nacht bei 4°C in Fixierlösung inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel viermal für 10 min mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 60 min mit Inkubationslösung behandelt. Daraufhin folgten 6 Waschdurchgänge mit ddH₂O für jeweils 10 min. Das Gel wurde mit Färbelösung für 60 min schüttelnd inkubiert und anschließend zweimal für 1 min mit ddH₂O gewaschen. Die Entwicklerlösung wurde auf das Gel gegeben und die Färbung wurde durch die Zugabe der Stopp-Lösung abgebrochen. Anschließend wurde das Gel fotografiert.

3.3.5 Western Blot (*semi-dry*)

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran übertragen werden. Anschließend können Antigene über eine Immunodetektion nachgewiesen werden. Dafür bindet ein Primärantikörper spezifisch an das gewünschte Antigen. Ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper bindet wiederum den Primärantikörper. Durch Zugabe von Luminol kann das Antigen über Chemilumineszenz nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde das *semi-dry* Verfahren angewandt. Für den Elektroblot wurde eine passend zugeschnittene PVDF-Membran für 3 min in Methanol aktiviert. Diese wurde daraufhin auf zwei Whatmanpapieren, welche in 1 x Blotbuffer getränkt waren, platziert.

Anschließend wurde das Trenngel auf der Membran positioniert. Alles zusammen wurde für kurze Zeit geschwenkt, um das Gel mit 1 x Blotpuffer zu äquilibrieren. Die zwei Whatmanpapiere, die Membran und das Gel wurden schließlich in angegebener Reihenfolge auf die Anode der Transferkammer gelegt. Zwei weitere getränkte Filterpapiere wurden auf dem Gel positioniert. Anschließend wurde die Kathode auf die Apparatur gesetzt. Der Transfer erfolgte pro Gel bei 101 mA für bis zu 2.5 h.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in ddH₂O äquilibriert. Anschließend wurde die Membran für 5 min in 0.1 % PonceauS gefärbt, um die gleichmäßige Gelbeladung zu überprüfen. Der Hintergrund wurde daraufhin mit ddH₂O entfärbt. Zur Dokumentation wurde die Membran eingescannt. Anschließend wurde die Membran passend zugeschnitten und mittels TBS-T vollständig entfärbt.

Für die Immunodetektion wurde die Membran für 1 h in 5 % Milchpulver gelöst in TBS-T geblockt. Dies diente der Absättigung unspezifischer Bindestellen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem spezifischen Primärantikörper bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Dafür wurde der entsprechende Antikörper in 5 % Milch oder 5 % BSA in TBS-T verdünnt (zwischen 1:500 und 1:2000). Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran viermal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Schließlich erfolgte die Inkubation mit dem spezie-spezifischen Sekundärantikörper. Dieser wurde 1:2000 bzw. 1:10.000 in 5 % Milchpulver in TBS-T verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran erneut viermal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Für die Detektion der Chemilumineszenz wurde die Membran schließlich für 1-5 min in dem Amersham ECL Westernblot Detektionsreagenz oder dem Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat inkubiert. Die Lumineszenz wurde schließlich unter Verwendung des *ChemiDoc™ Touch Imaging Systems* detektiert.

Um weitere Antigene auf derselben Membran nachzuweisen, wurde diese für 5 min in Methanol reaktiviert und anschließend erneut für 1 h in 5 % Milchpulver gelöst in TBS-T geblockt. Die Inkubation mit einem neuen Primärantikörper erfolgte erneut über Nacht bei 4 °C.

Nach der Detektion aller zu untersuchenden Antigene konnte die Membran mittels Coomassie Blue erneut gefärbt werden. Diese Färbung ist im Vergleich zur PonceauS Färbung intensiver. Die Membran wurde dafür in der Coomassie-Lösung für 10 min schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrunds durch mehrmaliges Waschen der Membran mit Entfärbelösung. Die Membran wurde getrocknet und dokumentiert.

3.3.6 Enzyme linked immuno sorbant assay (ELISA)

Der *Enzyme linked immuno sorbant assay* (ELISA) ermöglicht im Gegensatz zum Western Blot eine absolute Bestimmung der Proteinkonzentration eines Antigens aus einem Proteingemisch. In dieser Arbeit wurden über Sandwich-ELISA die Konzentrationen

verschiedener Antigene in Zellkulturüberständen untersucht. Verwendet wurden das *DuoSet ELISA Development System* von R&D Systems.

Zunächst wurden 100 µl des Fangantikörpers in einer *F96 Maxisorp Nunc-Immuno* Platte immobilisiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Am folgenden Tag wurden die Vertiefungen der Platte dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200 µl Blockpuffer in jede Vertiefung gegeben. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur folgten erneut drei Waschschrte mit 200 µl Waschpuffer. Daraufhin wurden je 100 µl Standardreihe sowie 100 µl der in Vollmedium-verdünnten Zellkulturüberstände in die Vertiefungen gegeben (Doppelwerte). Erneut folgte eine Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Vertiefungen dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Der Detektionsantikörper bindet ein anderes Epitop des Zielantigens und ist zudem biotinyliert. Dieser Antikörper wurde nun in Reagent Diluent verdünnt und je 100 µl des verdünnten Antikörpers wurden in die Vertiefungen der 96-Well Platte gegeben. Es folgte eine Inkubation für weitere 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Vertiefungen erneut dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die Streptavidin-HRP Lösung wurde in Reagent Diluent verdünnt (1:200 für IL-8 und CCL20; 1:40 für CXCL2, ICAM1, IL-6). Streptavidin bindet spezifisch an Biotin und somit an den Detektionsantikörper. Je 100 µl des verdünnten Streptavidin-HRPs wurde in die Vertiefungen gegeben. Nach 20 min Inkubation folgten erneut drei Waschschrte mit 200 µl Waschpuffer. Nun wurden 100 µl der Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert. Die Substratlösung besteht aus *Color Reagent A* (H₂O₂) und *Color Reagent B* (Tetramethylbenzidin). Die Streptavidin-gekoppelte Peroxidase katalysiert die Umsetzung dieses Substrats zu einem blauen Chromophor. Je intensiver die Blaufärbung auftrat, desto höher war die zugrundeliegende Konzentration des Antigens. Durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung wurde die Reaktion beendet und ein Farbumschlag ins Gelbe fand statt. Die Extinktion wurde bei 450 nm bestimmt. Anhand der OD-Werte der Standardreihe wurde eine Geradengleichung erstellt. Durch Einsetzen der Proben-Messwerte wurden die jeweiligen Proteinkonzentrationen berechnet. Die verschiedenen Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Antigen	Fangantikörper	Detektionsantikörper
IL-8	2 µg/ml	10 ng/ml
CXCL2	2 µg/ml	50 ng/ml
CCL20	1 µg/ml	10 ng/ml
ICAM1	2 µg/ml	50 ng/ml
IL-6	1 µg/ml	25 ng/ml

3.3.7 Sekretomanalyse über den *proximity extension assay* (PEA)

Für die unvoreingenommene Sekretomanalyse mittels Olink wurde ein sogenannter *proximity extension assay* (PEA) durchgeführt. Dieser basiert auf der spezifischen Bindung von zwei Antikörpern, welche an Oligonukleotide gekoppelt sind, an zwei unterschiedliche Epitope eines

Proteins. Haben beide Antikörper das Protein gebunden, kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotide. Über eine PCR können diese daraufhin amplifiziert werden. Die Auswertung erfolgt über Sequenzierung (NGS) der amplifizierten Oligonukleotide. Der PEA wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Johannes Graumann (Institut für translationale Proteomics, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Dafür wurden 80 µl der geernteten Zellkulturüberstände benötigt.

3.3.8 Metabolische Markierung mittels L-HPG und KLINK Chemie

L-Homopropargylglycine (L-HPG) ist ein Methionin-Analogon, welches eine Alkin-Gruppe besitzt. Nach Einbau in neu-synthetisierte Proteine anstelle von Methionin, kann das L-HPG über eine KLINK Reaktion mit Biotin-Azid konjugiert werden. Biotinylierte Proteine können anschließend über einen Streptavidin-Pulldown aufgereinigt und analysiert werden. In dieser Arbeit wurde das Protokoll zur Durchführung dieser Methode mit Zellkulturüberständen etabliert (Priester et al., 2023). Ziel war die unvoreingenommene Analyse des naszierenden Sekretoms. Das finale Protokoll wird im Folgenden beschrieben.

Für die Markierung der Zellen mit L-HPG wurden diese in 145 mm Schalen ausgesät. Vor der Behandlung wurden die Zellen dreimal mit warmem DPBS gewaschen, um restliches Methionin oder auch Serum von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Methionin-freiem Medium (zzgl. 6 mM L-Glutamin, 0.5 mM L-Cystein, 20 µg / mL Streptomycin, 20 U / mL Penicillin) kultiviert. Daraufhin folgte direkt die Behandlung der Zellen beispielsweise mit IL-1α [10 ng/ml] oder Cycloheximid [10 µg/ml]. Außerdem wurden die Zellen gleichzeitig mit L-HPG [25 µM] markiert. Zur Kontrolle wurden weitere Zellen mit L-Methionin [25 µM] behandelt. Zellkulturüberstände (oder Zellen) wurden schließlich geerntet (siehe 3.2.4).

Die gesamten 10 ml des Zellkulturüberstands wurden nach Entfernung von möglichen Zelldebris in ein 50 ml Falcon überführt und 40 ml kaltes Aceton (-20 °C) wurden langsam hinzugegeben. Anschließend wurde der Überstand über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gefällten Proteine bei 15,000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Aceton wurde entfernt und 2 ml kaltes (4 °C) Methanol wurden zu dem Pellet gegeben. Die Probe wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 15,000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Erneut wurde das Proteinpellet mit 2 ml Methanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 1 ml KLINK Chemie Lyse-Puffer resuspendiert. **Optional** konnte nun ein *PreClearing* durchgeführt werden. Dafür wurden 50 µl *Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads* in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Lagerungspuffer wurde mit Hilfe eines Magnets entfernt und die Beads zweimal in 500 µl KLINK Chemie Lyse-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde 1 ml Proteinpräzipitat auf die Beads gegeben und diese über Nacht bei 4 °C rotierend

(Intellimixer RM-2, Programm F1, 22 rpm) inkubiert. Wurde kein *PreClearing* durchgeführt konnte das Proteinpräzipitat bis zum Folgetag bei -80 °C gelagert werden oder die KLINK Reaktion direkt durchgeführt werden. Bei der KLINK Reaktion handelt es sich um eine Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition. In dieser Arbeit wurde hierfür Biotin-Azid eingesetzt, um L-HPG markierte Proteine zu biotinylieren. Für die KLINK Reaktion wurde der Reaktionsmix wie folgt frisch hergestellt. Pro Ansatz wurden 160 µl benötigt.

Reagenz	Stock Konzentration	Finale Konzentration	Verdünnung
Biotin-Azid	15.3 mM in DMSO (+Argon)	0.625 mM	1:24.5
TCEP	174.3 mM in H ₂ O	6.25 mM	1:27.9
TBTA	56.5 mM in DMSO (+Argon)	0.625 mM	1:90.4
CuSO ₄ *5H ₂ O	1 M in H ₂ O	6.25 mM	1:160
SDS	20 %	6.25 %	1:3.2
Add. H ₂ O			

Anschließend wurden 160 µl des Reaktionsmix zu 1 ml Proteinpräzipitat gegeben und dieses bei Raumtemperatur für 1.5 h und 22 rpm rotierend inkubiert. Es folgte eine erneute Präzipitation der Proteine. Dafür wurde das KLINK Konjugat in ein 50 ml Falcon überführt und mit 4 ml eiskaltem (-20 °C) Aceton versetzt. Zur Präzipitation folgte eine Inkubation über Nacht bei -20 °C. Am Folgetag wurden die präzipitierten und biotinylierten Proteine bei 15,000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Aceton wurde entfernt und 2 ml kaltes (4 °C) Methanol wurden zu dem Pellet gegeben. Die Probe wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 15,000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Erneut wurde das Proteinpellet wie beschrieben mit 2 ml Methanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 60 µl Waschpuffer I resuspendiert. **Optional** konnte das Pellet nun für Western Blot Analysen in 1 x Roti-Load resuspendiert werden. Sollten biotinylierte Proteine allerdings aufgereinigt werden, wurde ein Streptavidin-Pulldown durchgeführt. Dafür wurden 30 µl (für Western Blot) bzw. 40 µl (für LC-MS/MS) *Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads* in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Der Lagerungspuffer wurde mit Hilfe eines Magnets entnommen und die Beads zweimal in Waschpuffer I äquilibriert. Anschließend wurden erneut 500 µl Waschpuffer I auf die Beads gegeben. Zudem wurden 25 µl (für Western Blot) bzw. 35 µl (für LC-MS/MS) der Probe hinzugegeben. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 22 rpm (rotierend, Programm F1) und 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Beads mehrfach wie beschrieben gewaschen. Zuerst wurden die Beads zweimal mit 500 µl Waschpuffer I gewaschen. Dabei erfolgte stets eine Inkubation der Beads bei 4 °C und 22 rpm für 10 min. Der Puffer wurde jeweils mit Hilfe des Magnets entfernt. Anschließend wurden die Beads dreimal für 10 min mit 500 µl Waschpuffer II gewaschen. Zuletzt wurden die Beads dreimal mit 500 µl kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde der Puffer erneut entfernt. Entweder wurden die Beads nun mit 30 µl 2x Roti-Load versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert (für Western Blot) oder es wurden

60 µl MS-Puffer hinzugegeben (für LC-MS/MS). Die Proben wurden daraufhin im Western Blot analysiert oder direkt in das Massenspektrometrie-Labor (Dr. Uwe Linne, Institut für Massenspektrometrie und Elementanalytik, Philipps-Universität Marburg) gebracht. Die Beads sollten nicht eingefroren werden.

Sollte nicht das sekretierte Proteom, sondern die neu-synthetisierten Proteine in der Zelle untersucht werden, wurde das geerntete Zellpellet in 750 µl KLiCK Chemie Lyse-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 15 min und eine Zentrifugation bei 16,000 xg und 4 °C für 20 min. Der Überstand enthielt das Zell-Lysat. Dieses wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Messung (Pierce Bradford-Assay) bestimmt. Insgesamt 1.8 mg des Zell-Lysats wurden für das *PreClearing* verwendet. Dieses wurde mit 30 µl *High Capacity Streptavidin Agarose Resin* Beads durchgeführt. Am Folgetag wurde die KLiCK Reaktion und die Proteinfällung analog zu den Zellkulturüberständen durchgeführt. Nach den Waschschritten mit Methanol wurde das Pellet getrocknet und in 120 µl PBS mit 0.1 % SDS resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend über *Zeba Spin Columns* entsalzt und umgepuffert. Dafür wurden die Säulen in 1.5 ml Reaktionsgefäße gestellt und bei 1500 xg für 1 min zentrifugiert. Die Lagerlösung wurde entfernt und 300 µl Waschpuffer I wurde auf die Säule gegeben. Erneut wurde bei 1500 xg für 1 min zentrifugiert. Der Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und mit der Probe beladen. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 1500 xg. Das Eluat wurde auf Eis gestellt und die Säule verworfen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Messung (Pierce Bradford) bestimmt. Für den Streptavidin-Pulldown wurden 450 µg KLiCK Lysat eingesetzt. Der Pulldown wurde analog zu den Zellkulturüberständen allerdings mit *Streptavidin Agarose Resin Beads* durchgeführt. Für das Waschen der Beads wurden diese bei 1000 xg und 4 °C für 2 min zentrifugiert.

Sollten die biotinylierten Proteine im Western Blot analysiert werden, wurde die Membran nach erfolgtem Proteintransfer über Nacht in 5 % BSA in TBS-T geblockt. Am folgenden Tag wurde die Membran für 1 h mit Streptavidin-HRP (1:5000 in 5 % BSA) inkubiert. Daraufhin wurde die Membran viermal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte wie beschrieben (siehe 3.3.5).

3.3.9 Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die massenspektrometrischen Analysen in dieser Arbeit wurden von Dr. Uwe Linne (Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Die Vorgehensweise zur Vorbereitung und Messung der Proben wurde in Priester et al., 2023 detailliert beschrieben. Es wurde ein *On-Beads* Verdau mittels Trypsin durchgeführt. Anschließend wurde eine Reduzierung und Alkylierung der Peptide vorgenommen. Über *C18 SPE centrifuge-columns* (Macherey-Nagel) wurden die Peptide anschließend gereinigt und konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt

und 200 ng Protein wurden für die Messung am timsTOF Pro eingesetzt. Die Rohdaten wurden schließlich mit MaxQuant verarbeitet. Die weitere Analyse erfolgte mit der Perseus-Software. Auch die Vorgehensweise für die Auswertung wurde in der genannten Publikation beschrieben.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Design von sgRNAs

Für die Etablierung des Auxin-induzierten Degron Systems wurden sgRNAs benötigt, welche die Endonuklease Cas9 zum Stopp-Codon von CDK12 leiteten. Dort sollte ein gezielter Doppelstrangbruch induziert werden. Die genomische Sequenz des humanen *CDK12* Gens wurde von NCBI heruntergeladen und in die Seq-Builder Anwendung von DNA Star kopiert. Für das Design der sgRNAs wurde die Webseite <http://chopchop.cbu.uib.no/> verwendet. Dafür wurde das gewünschte Gen (CDK12) auf der Webseite eingegeben und passende sgRNAs wurden generiert. sgRNAs, welche nahe des Stopp-Codons lagen und einen hohen Score aufwiesen, wurden ausgewählt. Die Sequenzen der sgRNAs wurden im SeqBuilder markiert. Die *Protospacer Adjacent Motif* (PAM)-Sequenz (N^{GG}) und die Schnittstelle wurden überprüft und markiert. Die Endonuklease Cas9 schneidet die DNA drei Nukleotide *upstream* der PAM Sequenz. Diese PAM-Sequenz dient im Allgemeinen als Erkennungssequenz für das CRISPR/Cas9 System.

Es wurden sowohl *sense* als auch *antisense* sgRNAs bei Eurofins Genomics bestellt. Die sgRNAs wurden vorher mit Nukleotiden (5'-CACCG-3') ergänzt, welche die Restriktion mittels Bpil ermöglichten:

sense: CACCG – 20 bp sgRNA –
antisense: AAAC – 20 bp sgRNA – C

3.4.2 Klonierung von sgRNAs in den pX330 Vektor

Der pX330 Vektor codiert für die Endonuklease Cas9. Für den gerichteten Doppelstrangbruch in Nähe des Stopp-Codons von CDK12 wurden die sequenz-spezifischen sgRNAs, welche den Bereich um das Stopp-Codon flankierten (siehe 3.4.1), in diesen Vektor kloniert. Dafür wurden die von Eurofins Genomics synthetisierten einzelsträngigen (ss) sgRNAs vorerst hybridisiert, um doppelsträngige (ds) sgRNAs zu erhalten. Folgender Reaktionsansatz wurde angesetzt und unter den gezeigten Temperaturbedingungen im Thermocycler inkubiert.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
sgRNA (se) (100 µM)	1 µl	95 °C	4 min
sgRNA (as) (100 µM)	1 µl	70 °C	10 min
T4 PNK Puffer A	5 µl	37 °C	15 min
ddH ₂ O	43 µl	4 °C	Pause

Im nächsten Schritt wurde die doppelsträngige sgRNA enzymatisch phosphoryliert. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt und unter Verwendung des gezeigten Temperaturprofils inkubiert. Die Inkubation bei 70 °C diente der Inaktivierung der T4 Polynukleotid Kinase (PNK).

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
sgRNA (ds)	2 µl	37 °C	30 min
T4 PNK Puffer A	1 µl	70 °C	10 min
ATP (1mM)	1 µl	4 °C	Pause
T4 PNK	1 µl		
ddH ₂ O	5 µl		

Anschließend wurde der Restriktionsverdau des pX330 Vektors über Bpil durchgeführt und die phosphorylierten, doppelsträngigen sgRNAs (p-ds-sgRNA) wurden in den Vektor ligiert. Dafür wurden die p-ds-sgRNAs vorerst verdünnt (1:8 in ddH₂O). Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil für den Verdau und die Ligation sind im Folgenden dargestellt.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
pX330 (100 ng)	1 µl	37 °C	30 min
p-ds-sgRNA (1:8)	2 µl	21 °C	5 min
FastDigest Puffer	2 µl		
ATP (10 mM)	1 µl		
Fast Digest Bpil	1 µl		
T4 Ligase	1 µl		
ddH ₂ O	12 µl		

Zuletzt wurde die restliche linearisierte DNA mit der Exonuklease *PlasmidSafe* verdaut. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz und das dargestellte Temperaturprofil verwendet.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
Ligationsansatz	10 µl	37 °C	30 min
PlasmidSafe Puffer	1.5 µl	70 °C	30 min
ATP (10 mM)	1.5 µl		
PlasmidSafe DNase (10 U/µl)	1 µl		

Die klonierten Vektoren (pX330_sgRNA1_CDK12 oder pX330_sgRNA2_CDK12) wurden anschließend in *E.coli* transformiert und amplifiziert (siehe 3.1.1). Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und am Folgetag wurden einzelne Kolonien gepickt. Die Plasmid-DNA wurde am darauffolgenden Tag aufgereinigt und die Konzentration am NanoDrop bestimmt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA sequenziert (siehe 3.4.9). Zeigten die Klone einen erfolgreichen Einbau der sgRNA wurde das Plasmid erneut in Maxikulturen amplifiziert.

3.4.3 Bestellung von Donorvektoren mit Homologie-Armen (HA)

Donorvektoren dienen als Reparatur-Template für die homologe Rekombination der Zelle. Um die Donorvektoren über Basenpaarung zum Cas9-induzierten Doppelstrangbruch zu führen, sollten diese Vektoren sogenannte Homologiearme enthalten. Für die Etablierung des Auxin-induzierten Degron System wurde der Doppelstrangbruch gezielt in Nähe des Stopp-Codons eingeführt. Die genomische Sequenz von CDK12 wurde von NCBI heruntergeladen und die Sequenz um das Stopp-Codon wurde in die Seq-Builder Anwendung von DANN Star kopiert. Die Homologiearme lagen 175 bp *upstream* (HA-L) und 175 bp *downstream* (HA-R) des Stopp-Codons und wurden entsprechend markiert. Das Stopp-Codon zwischen den beiden Homologiearmen wurde entfernt. Stattdessen wurde eine BamHI-Schnittstelle zwischen den HAs eingebaut, um die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten dort später inserieren zu können.

HA-L (175 bp) – G | GATC | C – HA-R (175 bp)

Zudem wurden mögliche PAM-Sequenzen (NGG) stumm mutiert, um das Zerschneiden des Template durch Cas9 zu verhindern. Außerdem musste überprüft werden, ob die Sequenz weitere BamHI Schnittstellen besaß. Wäre dies der Fall gewesen, hätten auch diese stumm mutiert werden müssen.

Die HA-Donorvektoren wurden durch Biocat synthetisiert. Es handelte sich um einen pUC57-Kan Vektor mit der 5' Restriktionsstelle XbaI und der 3' Restriktionsstelle HindIII.

3.4.4 Klonierung der mAID-(mClover)-Resistenzkassetten aus Addgene-Vektoren in den pUC57-Kan-CDK12-HAs Vektor

Um die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten gezielt in das Genom zu integrieren, sollten diese Kassetten in den pUC57-Kan-CDK12-HAs Vektor zwischen die beiden Homologiearme (siehe 3.4.3) inseriert werden. Dafür wurden die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten (mAID_Neo; mAID-Hygro; mAID-mClover_Neo; mAID-mClover_Hygro) aus den kommerziellen Addgene Vektoren (siehe 2.7) über BamHI enzymatisch ausgeschnitten. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil für den Verdau sind dargestellt.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
Addgene-Vektor	1 µg	37 °C	5 min
10x FastDigest Puffer	2 µl	80 °C	5 min
BamHI FD	1 µl		
H ₂ O	add. 20 µl		

Anschließend wurde der Verdau auf ein 1 % Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetragen. Die DNA Fragmente wurden bei 100 V für 2 h aufgetrennt. Das Gel wurde daraufhin für 20 min in 150 ml 2 % Methyleneblau gefärbt. Durch mehrmaliges Waschen mit H₂O wurde der Hintergrund entfärbt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Mit Hilfe eines Skalpell wurden

die jeweiligen Banden ausgeschnitten. Die Größen der jeweiligen Kassetten sind im Nachfolgenden dargestellt.

Plasmid-DNA	mAID-Kassette	Vektor
mAID-mClover Neo	3242 bp	2875 bp
mAID-mClover Hygro	3511 bp	2875 bp
mAID Neo	2519 bp	2875 bp
mAID Hygro	2788 bp	2875 bp

Die mAID-(mClover) Inserts wurden nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt.

Nach Aufreinigung der mAID-(mClover)-Kassetten aus den Addgene-Vektoren wurde der pUC57-Kan CDK12-HA Vektor für die Ligation vorbereitet. Dafür musste der Vektor linearisiert und dephosphoryliert werden. Für die Linearisierung wurde der Vektor mittels BamHI enzymatisch verdaut. Die BamHI Schnittstelle befand sich zwischen den beiden Homologiearmen. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil für die Linearisierung sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
pUC57-Kan HA	1 µg	37 °C	5 min
10x FastDigest Puffer	2 µl	80 °C	5 min
BamHI FD	1 µl		
ddH ₂ O	add. 20 µl		

Für die Dephosphorylierung wurde 1 µl Calf-intestinal alkaline phosphatase (CIAP) zu dem Ansatz gegeben und dieser wurde erneut für 5 min bei 37 °C und anschließend für 15 min bei 65 °C inkubiert. Der linearisierte Vektor wurde nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Die Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt. Nach erfolgter Aufreinigung der mAID-(mClover)-Kassetten und der Linearisierung des pUC57-Kan CDK12-HAs Vektor, konnten die Kassetten mittels T4 Ligase in den linearisierten Vektor ligiert werden. Dafür wurde ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 gewählt. Es wurden jeweils 25 ng des pUC57-Kan CDK12-HAs Vektor eingesetzt. Die entsprechenden Mengen der jeweiligen mAID-(mClover)-Resistenzkassetten wurde anhand der Insertgröße mittels NEBioCalculator von BioLabs, New England berechnet. Die verschiedenen Reaktionsansätze und das entsprechende Temperaturprofil für die Ligation sind nachfolgend dargestellt.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
pUC57-Kan HA	25 ng	RT	10 min
Insert	X ng	65 °C	10 min
10x T4 Ligase Puffer	2 µl		
T4 Ligase	1 µl		
ddH ₂ O	add. 20 µl		

Insert	Menge
mAID-mClover Neo	83 ng
mAID-mClover Hygro	90 ng
mAID Neo	64 ng
mAID Hygro	71 ng

Im Anschluss wurden 5 µl des Ligationsansatzes in *E.coli* XL-1 Blue transformiert (siehe 3.1.1). Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Am Folgetag wurden einzelne Kolonien gepickt. Die Plasmid-DNA wurde am darauffolgenden Tag mittels Mini-Präp aufgereinigt und die Konzentration am NanoDrop bestimmt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA sequenziert (siehe 2.4.9). Zeigten die Klone eine erfolgreiche Insertion, wurde das Plasmid erneut in Maxikulturen amplifiziert.

3.4.5 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen

Um amplifizierte Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde je nach Suspensionsvolumen eine Aufreinigung nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Plasmid Kit für Mini-Kulturen oder dem NucleoBond PC 500 Kit für Maxi-Kulturen von Macherey Nagel durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit einer geeigneten Menge ddH₂O eluiert. Die Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

3.4.6 Aufreinigung von genomischer DNA aus humane Zellen

Um die genomische DNA aus eukaryotischen Zellen zu isolieren, wurde die Aufreinigung nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® Tissue Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 80 µl vorgewärmten BE-Puffer (70 °C) eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA am NanoDrop bei 260 nm gemessen.

3.4.7 Polymerasenkettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Um beliebige Abschnitte der genomischen DNA gezielt zu amplifizieren, wurde eine Polymerasenkettenreaktion (PCR) unter Verwendung der GoTaq DNA-Polymerase durchgeführt. Verwendet wurde dafür ein entsprechender Reaktionsansatz, sowie ein geeignetes Temperaturprofil im Thermocycler T Professional. Beides ist im Folgenden dargestellt. Die Dauer der DNA-Elongation (72 °C) hing dabei von der Größe des Amplifikats ab.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
gDNA	200 ng	95 °C	2 min
5x GoTaq Flexi Puffer	4 µl	95 °C	30 s
dNTPs (10 mM)	0.4 µl	60 °C	30 s
MgCl ₂ (25 mM)	3.2 µl	72 °C	1 min/kb
Primer sense (10 µM)	1 µl	72 °C	5 min
Primer antisense (10 µM)	1 µl		
GoTaq Polymerase	0.1 µl		
ddH ₂ O			

35 x

3.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA Fragmente aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei wandern kleine Fragmente schneller durch die Gelmatrix als größere Fragmente. Durch Färbung mit Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert und daraufhin unter UV-Strahlung sichtbares Licht emittiert, können die DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden.

Zur Herstellung des Gels wurden 1% oder 1.5 % Agarose in 130 ml TAE-Puffer aufgekocht und schließlich mit 0.1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Lösung wurde in die Gelvorrichtung überführt und für 20 min inkubiert. War das Gel polymerisiert, konnten die Proben aufgetragen werden. Dafür wurde das Elektrophorese-System mit 1x TAE-Puffer befüllt. Jeweils 20 µl der Probe, welche mit 6x Loading Dye versetzt wurde, und 8 µl des DNA-Standard wurden aufgetragen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente bei 100 V für 40 min aufgetrennt. Für die Dokumentation wurde der *UV-Transilluminators Gel iX Imager* verwendet.

3.4.9 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierungen von PCR-Amplifikaten oder von klonierter Plasmid-DNA wurde von LGC Genomics oder Mircrosynth durchgeführt. Den Angaben bzw. Anforderungen der Firmen zu Konzentrationen, Volumina und verwendeten Primern wurde gefolgt. Die Ergebnisse wurden mittels DNASTar visualisiert und analysiert.

3.4.10 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Um Aussagen über die Genexpression treffen zu können, wurde die RNA aus humanen Zelllinien isoliert. Dafür wurde das NucleoSpin® RNA Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA wurde dabei mit einer geeigneten Menge RNase-freiem H₂O eluiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration und die Reinheit der RNA am NanoDrop bestimmt. Isolierte RNA wurde langfristig bei -80 °C gelagert.

3.4.11 Reverse Transkription (RT)

Damit Genexpressionsanalysen mittels quantitativer PCR (qPCR) durchgeführt werden können, muss die vorhandene RNA vorerst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dafür wird sich die Eigenschaft der sogenannten reversen Transkriptase zunutze gemacht. Es handelt sich hierbei um ein Enzym aus Retroviren (Moloney-Maus-Leukämie Viren), welches die RNA als Matrize verwendet, um einen komplementären DNA-Strang zu erzeugen. Für die reverse Transkription (RT) wurden jeweils 1.5 µg RNA bei einem Ansatzvolumen von 30 µl eingesetzt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und das verwendete Temperaturprofil der RT sind im Folgenden dargestellt.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
RNA	1.5 µg	25 °C	10 min
5x RT-Puffer	6 µl	42 °C	60 min
Random Hexamer Primer	0.75 µl	70 °C	10 min
dNTPs (10 mM)	0.75 µl		
RevertAid rM-MuLV	0.75 µl		
Reverse Transkriptase			
RNase-freies H ₂ O	add. 30 µl		

3.4.12 Quantitative Polymerasenkettenreaktion (qPCR)

Nach Durchführung der reversen Transkription (RT) kann die generierte cDNA für eine quantitative PCR (RT-qPCR) eingesetzt werden. Hierbei werden spezifische cDNA-Sequenzen gezielt amplifiziert. Unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen kann eine quantitative Analyse der PCR mittels photometrischer Bestimmung der PCR-Produktmenge in Echtzeit erfolgen. Da wiederum ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten cDNA und dem PCR-Produkt besteht, können Aussagen über die Genexpression bzw. die zugrundeliegende mRNA Menge in der Zelle getroffen werden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Systeme für die RT-qPCR verwendet, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

Zum einen wurde der SYBR Green Assay verwendet. Bei SYBR Green handelt es sich um einen Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff, welcher doppelsträngige DNA bindet. Bei der Entstehung von DNA-Doppelsträngen wird die messbare Fluoreszenz somit erhöht. Dieser Farbstoff ist allerdings nicht spezifisch für das jeweilige PCR-Produkt. Die Spezifität der verwendeten Primer wurde im Anschluss an die PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse getestet. Die Temperatur wurde dafür kontinuierlich erhöht, um den spezifischen DNA-Doppelstrang aufzuschmelzen und den Farbstoff wieder freizusetzen. Über die Dissoziationskurve konnte schließlich analysiert werden, ob während der PCR lediglich ein spezifisches PCR-Produkt entstanden war.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und das verwendete Temperaturprofil für die PCR und die Schmelzkurvenanalyse sind im Nachfolgenden dargestellt.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
cDNA	1 µl	95 °C	20 s
FAST SYBR Green PCR	5 µl	95 °C	3 s
Master Mix		60 °C	30 s
Primer sense (10 µM)	0.25 µl	Schmelzkurve	40 x
Primer antisense (10 µM)	0.25 µl		
RNase-freies H ₂ O	3.5 µl		

Zum anderen wurden *Taqman Assays on Demand* von Applied Biosystems verwendet. Die sequenz-spezifischen Taqman-Sonden tragen am 5' Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (FAM) und am 3' Ende den Quencher Tetramethylrhodamin (TAMRA).

Durch die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird die emittierte Fluoreszenz des Reporters abgeschwächt. Zugrundeliegend ist hierbei der sogenannte *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Während der Synthese des komplementären Stranges trifft die Taq-Polymerase auf die sequenz-spezifische Sonde, welche die Zielsequenz gebunden hat. Die Taq-Polymerase besitzt zusätzlich eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, welche dafür sorgt, dass der Reporterfarbstoff freigesetzt wird. Der Reporter befindet sich somit nicht mehr in räumlicher Nähe des Quenchers und die emittierte Fluoreszenz ist messbar. Die Fluoreszenz nimmt somit proportional zur Menge der zugrundeliegenden cDNA zu.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und das verwendete Temperaturprofil RT-qPCR mittels *Taqman Assay on Demand* sind im Nachfolgenden dargestellt.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
cDNA	1 µl	95 °C	20 s
Taqman Fast PCR Mastermix	5 µl	95 °C	3 s
Taqman-Sonde	0.25 µl	60 °C	30 s
RNase-freies H ₂ O	3.75 µl		

40 x

Für die Auswertung der Daten wurde in dieser Arbeit die sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt. Es handelt sich hierbei um eine relative Quantifizierung bezogen auf die Ct-Werte eines Referenzgens (ActB) und einer Kalibratorprobe. Bei dem Ct-Wert (*cycle threshold*) handelt es sich um die Anzahl an Zyklen, die benötigt wird, um einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) des Fluoreszenzsignals zu überschreiten. Je niedriger der Ct-Wert, desto weniger Zyklen wurden benötigt, um den Schwellenwert zu erreichen und umso mehr cDNA lag der Messung zugrunde. Ein niedrigerer Ct-Wert weist also auf eine verstärkte Genexpression hin.

Im ersten Schritt der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wird für die Normalisierung auf eine endogene Kontrolle die Differenz der Ct-Werte von Referenzgen (in diesem Fall ActB) und Zielgen gebildet.

$$\text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}} = \Delta\text{Ct}$$

Im Anschluss wird die Differenz zwischen der jeweiligen Probe und einer Kalibratorprobe gebildet, um die differentielle Expression zu berechnen. Bei der Kalibratorprobe handelt es sich meist um unbehandelte oder DMSO-behandelte Zellen.

$$\Delta\text{Ct-Wert}_{\text{ProbeX}} - \Delta\text{Ct-Wert}_{\text{Kalibrator}} = \Delta\Delta\text{Ct-Wert}$$

Die x-fache mRNA Expression wird letztendlich wie folgt angegeben:

$$\text{x-fache Expression des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.4.13 Sequenzierung der RNA

Die RNA-Sequenzierung (RNASeq) wurde in dieser Arbeit von Novogene durchgeführt. Dafür wurden 25 µl (30 ng/µl) RNA zu Novogene geschickt. Dort wurde eine polyA-Anreicherung durchgeführt und somit lediglich messenger RNAs (mRNAs) sequenziert. Die DeSeq2 Auswertung der Daten wurde ebenfalls von Novogene übernommen.

3.5 Bioinformatische Auswertungen

3.5.1 Auswertung von Omics-Daten

Daten, welche mittels Massenspektrometrie erhoben wurden, wurden mittels Perseus ausgewertet (Priester et al., 2023; Tyanova and Cox, 2018). Der Student's T-Test wurde mittels Perseus durchgeführt, um deregulierte Proteine (DEP) zu identifizieren. Die Liste der DEPs wurde anschließend über Excel 2016 weiter analysiert, gefiltert und z.B. in Form von *heatmaps* visualisiert.

Transkriptom und Sekretomdaten wurden von den Firmen Novogene bzw. Olink (Prof Graumann – Universität Marburg) analysiert. Auch die statistischen Auswertungen wurden von den jeweiligen Firmen/Arbeitsgruppen durchgeführt. Die Liste der deregulierten Gene bzw. Proteine wurde anschließend über Excel 2016 weiter analysiert, gefiltert und z.B. in Form von *heatmaps* visualisiert.

Venn Diagramme wurden über die frei zugängliche Anwendung von <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> erstellt. Überrepräsentationsanalysen wurden mittels Metascape Software durchgeführt, welche über <https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1> zugänglich ist. Die Software nutzt die Ontologiequellen GO Biological Processes, CORUM, KEGG Pathway, WikiPathways, Canonical Pathways, Reactome Gene Sets, TRRUST, DisGeNET, PaGenBase, COVID, PANTHER Pathway und Transcription Factor Targets sowie alle Gene im Genom als Hintergrund für die Anreicherung. Die Berechnungen der P-Werte erfolgten unter Verwendung der kumulativen, hypergeometrischen Verteilung. Die Berechnung der q-Werte erfolgte auf der Grundlage des Benjamini-Hochberg-Verfahrens (Zhou et al., 2019). Die Datenmatrix der NPX-Werte und Z-Skalierungen sowie das k-means Clustering wurde mittels Morpheus Software des Broad Institute erstellt. Die Software ist ebenfalls über <https://software.broadinstitute.org/morpheus/> frei zugänglich.

3.5.2 Statistische Auswertung

Es wurden stets ungepaarte, parametrische und zweiseitige T-Tests zur statistischen Auswertung durchgeführt. Die Analyse erfolgt dabei über GraphPad Prism (Version 9.5.0) oder Excel 2016.

4 Ergebnisse

4.1 Differentielle Effekte verschiedener CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) im IL-1 Signalweg systematisch in unterschiedlich perturbierten Modellsystem zu untersuchen. Insbesondere sollte die Bedeutung der CDKs in der IL-1 induzierten Genexpression von NF- κ B abhängigen Zielgenen analysiert werden. Zudem sollte die Rolle der CDKs bei der IL-1 vermittelten Sekretion von Zytokinen, welche für das Tumormikromilieu relevant sind, untersucht werden. Um diese Fragen zu adressieren, wurden initial verschiedene CDK Inhibitoren eingesetzt. Zum einen wurde der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol verwendet, welcher CDK1, CDK2, CDK4/6, CDK7 und CDK9 inhibiert. Zum anderen wurde der selektive CDK12/13 Inhibitor THZ531 eingesetzt (Abb. 1.5).

Um die Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg untersuchen zu können, wurde zunächst die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Inhibitoreffekte getestet. Hierzu wurden HCT116 Zellen und HeLa Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren für unterschiedliche Zeiten behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für Western Blot Analysen geerntet. Diese zeigten, dass durch Flavopiridol (Abb. 4.1 A) die Phosphorylierungen von Pol II an Ser2 und Ser5 zeit- und dosisabhängig in beiden Zelllinien abnahmen. Auch die Gesamtproteinmenge von Pol II wurde reduziert. Die Phosphorylierung von Rb war ebenfalls verringert, wenn die Zellen mit 10 μ M Flavopiridol oder für 24 h behandelt wurden. Die Gesamtproteinmengen von CDK4 und CDK6 wurden durch die Flavopiridol-Behandlung in beiden Zelllinien nicht beeinflusst. Für weiterführende Versuche wurde eine Konzentration von 10 μ M Flavopiridol gewählt. Wurden die Zellen im Vergleich mit THZ531 behandelt (Abb. 4.1 B), wurde ebenfalls eine zeit- und dosisabhängige Verringerung der Phosphorylierung von (S2)-Pol II gezeigt. Des Weiteren zeigte die Western Blot Analyse, dass cleaved-PARP (c-PARP), ein Marker für Apoptose (Oliver et al., 1998), erhöht detektierbar war, wenn die HeLa Zellen für 24 h mit 1 μ M bzw. für 6 h oder 24 h mit 10 μ M THZ531 behandelt wurden. In den HCT116 Zellen wurde c-PARP jeweils nach 24 h Behandlung detektiert (unabhängig von der Konzentration). Zusätzlich nahm die Phosphorylierung von H2AX (γ H2AX) in den HeLa Zellen zeit- und dosisabhängig zu. Bei γ H2AX handelt es sich um einen Marker für Doppelstrangbrüche bzw. DNA-Schäden (Kuo and Yang, 2008). In den HCT116 Zellen wurde γ H2AX überwiegend nach 24 h Behandlung detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Zellen in anschließenden Experimenten mit 1 μ M THZ531 behandelt. Die Detektion der Proteine Actinin und β -Actin diente jeweils dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung.

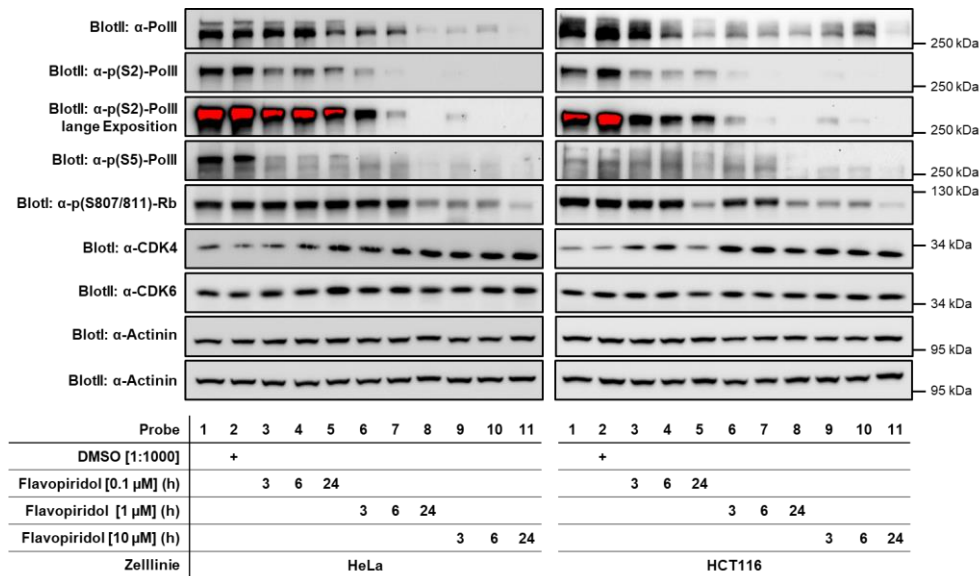
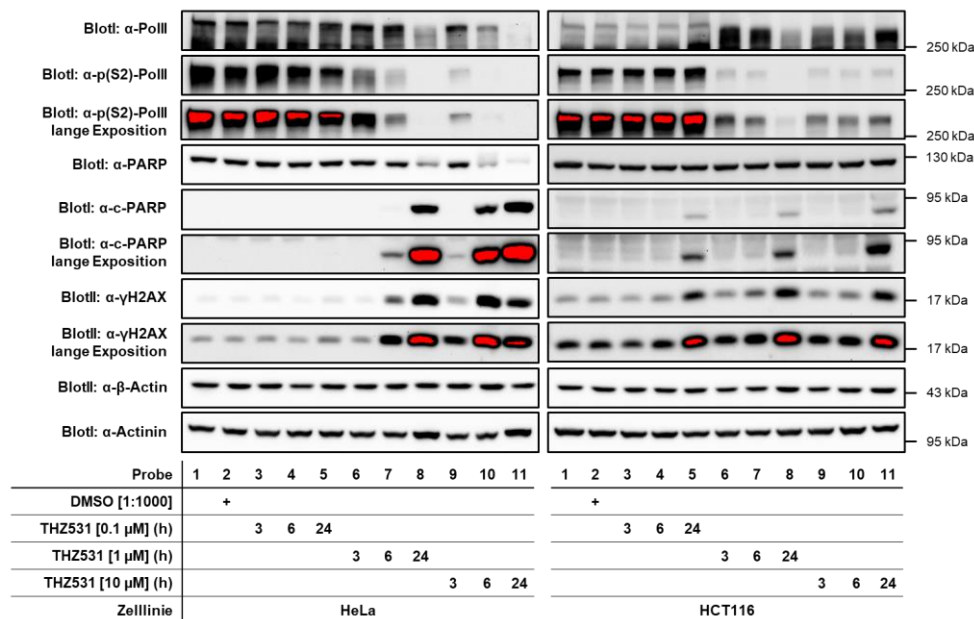
A**B**

Abb. 4.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Inhibitoreffekte von Flavopiridol und THZ531.

HCT116 und HeLa Zellen wurden für 3 h, 6 h oder 24 h mit 0.1 μM, 1 μM oder 10 μM (A) Flavopiridol oder (B) THZ531 behandelt. Zusätzlich wurden Zellen für 24 h mit 0.1 % DMSO behandelt. Dies diente der Lösungsmittelkontrolle. Die Zellen wurden geerntet und eine Gesamtzelllyse durchgeführt. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. Es wurde ein biologisches Replikat durchgeführt.

4.1.1 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion in HCT116 Zellen

Um den Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 induzierte Genexpression zu analysieren, wurden HCT116 Zellen mit 10 μM Flavopiridol oder 1 μM THZ531 vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Kontrolle mit DMSO behandelt, während weitere Kontrollzellen vollständig unbehandelt blieben. Nach einer Stunde Inkubation wurden

die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 α stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde dabei für Proteindetektionen mittels Western Blot lysiert. Aus den restlichen Zellen wurde die RNA für anschließende RT-qPCRs isoliert. Die Western Blot Analyse (Abb. 4.2 A) zeigte, dass die Gesamtproteinmenge von Pol II durch die Behandlung der HCT116 Zellen mit beiden Inhibitoren reduziert war. Auch die Phosphorylierung von (S2)-Pol II wurde durch Flavopiridol und THZ531 stark verringert. Im Gegensatz war die Phosphorylierung von Rb lediglich reduziert, wenn die Zellen mit Flavopiridol behandelt wurden. Die Inhibition von CDK12/13 für maximal 4 h hatte keinen Einfluss auf die Rb-Phosphorylierung und somit auf den G1/S Übergang des Zellzyklus. Um eine Aussage über den Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg treffen zu können, wurden verschiedene Komponenten des IL-1 Signalwegs im Western Blot detektiert. Beide Inhibitoren zeigten keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von p65 und die IL-1 induzierte Phosphorylierung von p65. In unbehandelten bzw. DMSO-behandelten Zellen wurde I κ B α nach 0.5 h IL-1 Stimulation degradiert, um die Translokation von NF- κ B in den Zellkern zu ermöglichen. Nach 1 h Stimulation setzte die Re-Synthese von I κ B α ein, so dass 3 h nach der Stimulation die Ausgangsproteinmenge wieder erreicht war. Wurden HCT116 Zellen mit Flavopiridol behandelt, wurde I κ B α ebenfalls 0.5 h nach der Stimulation proteasomal abgebaut. Die Behandlung mit Flavopiridol hatte allerdings eine nahezu komplette Inhibierung der Re-Synthese von I κ B α zur Folge. Wurden die Zellen im Vergleich mit THZ531 behandelt, wurde I κ B α ebenfalls nach 0.5 h IL-1 Stimulation degradiert. Die Re-Synthese von I κ B α war durch die Inhibition von CDK12/13 jedoch verlangsamt. I κ B α wurde exprimiert, jedoch war nach 3 h IL-1 Stimulation die Ausgangsproteinmenge noch nicht wieder erreicht (Abb. 4.2 B). Auch die IL-1 induzierte Synthese des NF- κ B-Inhibitors A20 wurde durch die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol vollständig supprimiert, während die Behandlung mit THZ531 für eine verringerte bzw. verlangsamte Synthese sorgte. Somit zeigten beide Inhibitoren einen Einfluss auf zwei zentrale zytosolische Inhibitoren des NF- κ B Signalwegs. Die Detektion der Proteine Actinin und β -Actin diente dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung. Für die Quantifizierungen wurden die Chemilumineszenz-Intensitäten der Western Blots bestimmt und auf diese normiert.

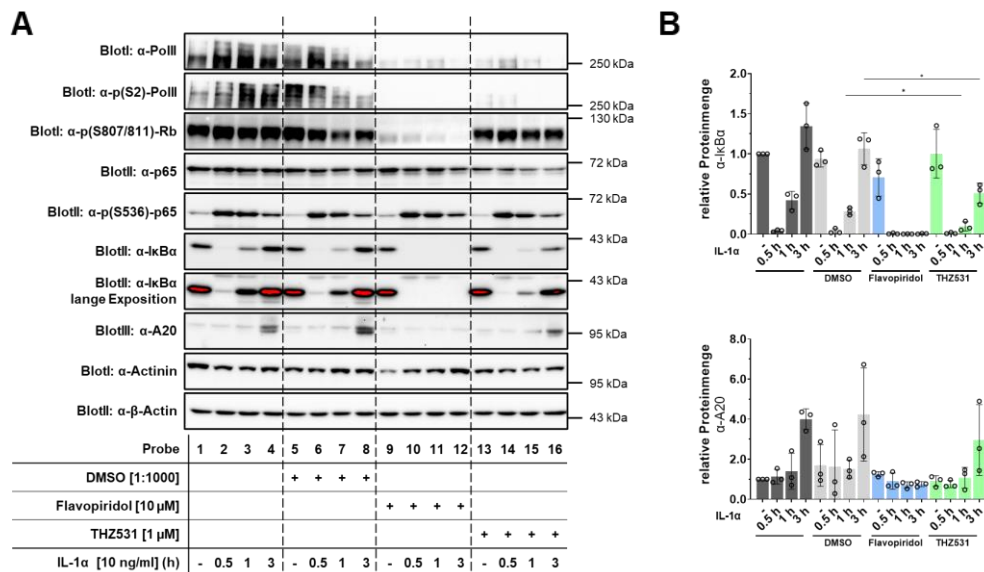


Abb. 4.2 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen.

(A) HCT116 Zellen wurden mit Flavopiridol [10 μM] oder THZ531 [1 μM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und eine Zellyse wurde durchgeführt. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen. Die Proteinmengen wurden auf die unbehandelte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$).

Die Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR (Abb. 4.3) deuteten darauf hin, dass Flavopiridol die IL-1 induzierte Genexpression erheblich supprimierte. Die Expression aller getesteten IL-1 Zielgene war praktisch nicht mehr induzierbar, wenn die Zellen mit Flavopiridol vorbehandelt wurden. Im Gegensatz dazu zeigte die THZ531-Behandlung differentielle Effekte auf verschiedene NF-κB Zielgene. Die Expression von *IL8*, *CXCL2*, *NFKBIA* und *CCL20* wurde nach 3 h IL-1 Stimulation durch THZ531 im Vergleich zu unbehandelten bzw. DMSO behandelten Zellen verstärkt. Nach nur 1 h IL-1 Stimulation war die Expression von *IL8* und *NFKBIA* hingegen reduziert. Die mRNA Mengen von *ICAM1* und *BIRC3* waren hingegen im Vergleich zu den Kontrollen zu jedem Zeitpunkt verringert. Das Lösungsmittel DMSO hatte keinen Einfluss auf die Expression der getesteten Gene.

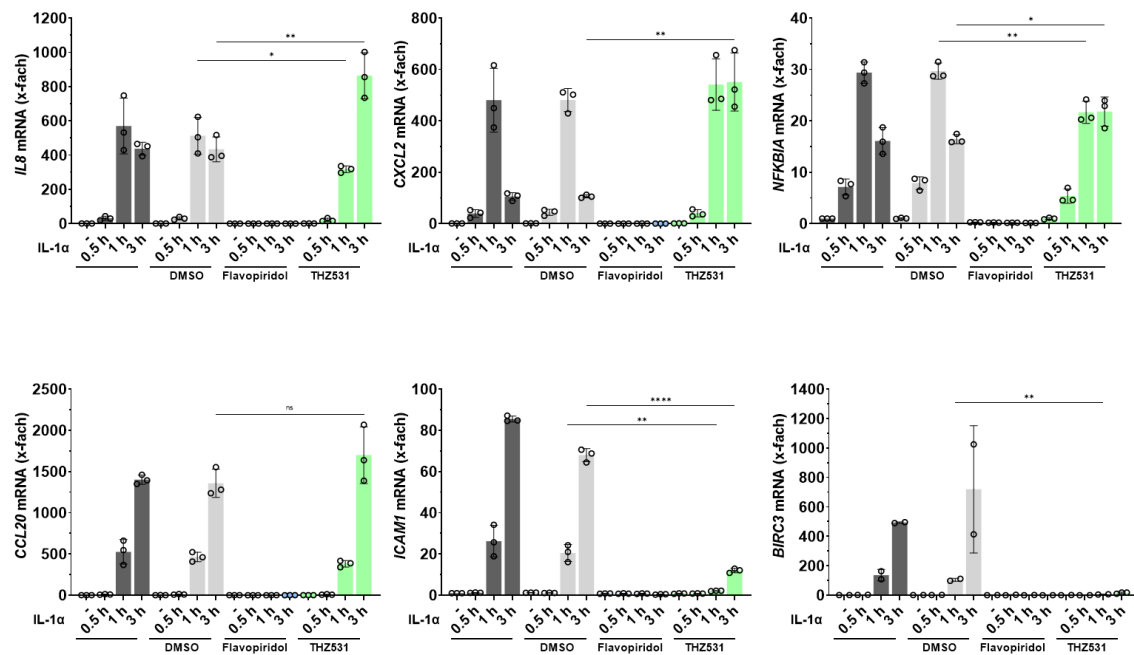


Abb. 4.3 Differenzieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in HCT116 Zellen.

HCT116 Zellen wurden mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet. Anschließend wurde die RNA isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Es wurden sowohl Taqman-qPCRs (*ActB*, *IL8*, *CXCL2*, *NFKBIA*, *CCL20* und *ICAM1*) als auch qPCRs mittels SYBR Green Assay (*ActB*, *BIRC3*) durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen *ActB* und die unstimulierte Probe. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Zusätzlich zu den Genexpressionsanalysen, wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die IL-1 vermittelte Proteinsekretion untersucht. Dafür wurden HCT116 Zellen mit 10 μ M Flavopiridol oder 1 μ M THZ531 vorbehandelt. Weitere Zellen wurden mit DMSO behandelt, während andere Zellen gänzlich unbehandelt blieben. Nach einer Stunde Vorbehandlung mit den Inhibitoren bzw. dem Lösungsmittel, wurden die Zellen für 16 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden im Anschluss für Sekretomanalysen geerntet. Zusätzlich wurden die geernteten Zellpellets lysiert, um die gemessenen Gesamteiproteinkonzentrationen auf die finale Zellzahl normalisieren zu können. Als Kontrolle der CDK Inhibition wurden die Lysate außerdem für Proteindetektionen im Western Blot eingesetzt. Es wurden ELISA Analysen durchgeführt, um die Proteinkonzentrationen von IL-8, CXCL2, CCL20 und ICAM1 in den Zellkulturüberständen absolut zu bestimmen.

Die im ELISA ermittelten Proteinkonzentrationen (Abb. 4.4) zeigten, dass Flavopiridol einen starken supprimierenden Effekt aufwies. Die IL-1 induzierte Sekretion aller gemessenen Proteine war deutlich unterdrückt. Die selektive Inhibition von CDK12/13 sorgte hingegen für einen Anstieg der Sekretion von CXCL2 und CCL20. Bereits die basale Sekretion von CXCL2 war nach der Behandlung der Zellen mit THZ531 im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht.

Im Gegensatz war das IL-1 vermittelte *shedding* von ICAM1 reduziert. Beim *shedding* werden extrazelluläre Domänen von Membranproteinen proteolytisch geschnitten und somit freigesetzt (Huovila et al., 2005). Dies spiegelte die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wider.

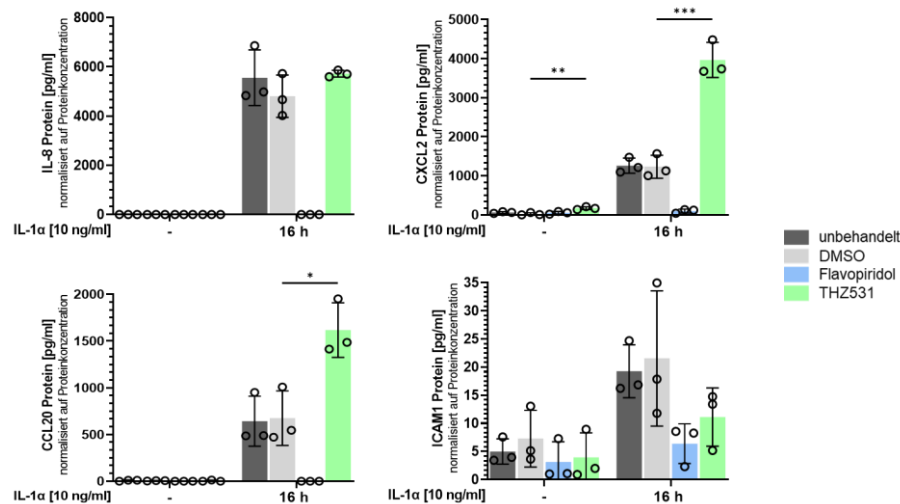


Abb. 4.4 Differentieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in HCT116 Zellen.

HCT116 Zellen wurden mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und im ELISA für IL-8, CXCL2, CCL20 und ICAM1 eingesetzt. Dargestellt sind die anhand den erstellten Standardreihen berechneten Proteinkonzentrationen. Die Werte wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normalisiert. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Die parallel zu den ELISA Versuchen durchgeführte Western Blot Analyse (Abb. 4.5 A) zeigte eine reduzierte Phosphorylierung von (S2)- und (S5)-Pol II durch beide Inhibitoren. Die Phosphorylierung von Rb war nach der Flavopiridol-Behandlung stark verringert. Auch die Inhibition von CDK12/13 führte nach 17 h zu einer Verringerung der Rb-Phosphorylierung. Des Weiteren wurde die Phosphorylierung von p65 nach 17-stündiger Behandlung mit beiden Inhibitoren, im Gegensatz zur 4 h Inkubation (Abb. 4.2), reduziert (Abb. 4.5 B). Die Gesamtproteinmenge von p65 war nach 16 h IL-1 Stimulation ebenfalls verringert und die Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren führte zu einer zusätzlichen Verminderung der p65-Menge. Die Synthese von I κ B α und A20 wurde durch Flavopiridol vollständig supprimiert. Bereits in der unstimulierten Probe war die I κ B α -Proteinmenge durch die pan-CDK Inhibition verringert. Die Inhibition von CDK12/13 resultierte in einer verringerten Synthese von A20 und I κ B α . Auch unter basalen Bedingungen war die I κ B α -Proteinmenge im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert. Die Detektion von β -Actin und Actinin diente der Ladungskontrolle.

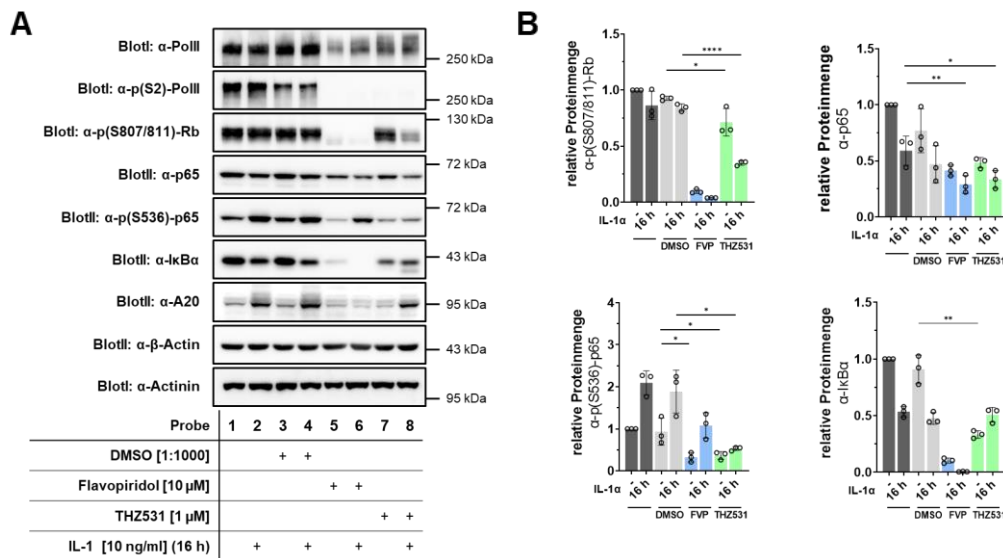


Abb. 4.5 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in HCT116 Zellen.

HCT116 Zellen wurden mit Flavopiridol (FVP) [10 μM] oder THZ531 [1 μM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und eine Zellyse wurde durchgeführt. (A) Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen. Die Proteinmenge wurde auf die unbehandelte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

4.1.2 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion in HeLa Zellen

Um die gezeigten Ergebnisse in einer weiteren Krebszelllinie zu validieren, wurden die Versuche mit HeLa Zellen durchgeführt. Bei HeLa Zellen handelt es sich um humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen. Um den Einfluss der CDK Inhibition auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 vermittelte Genexpression zu analysieren, wurde Flavopiridol oder THZ531 in das Zellkulturmedium der HeLa Zellen gegeben. Als Kontrolle blieben weitere Zellen unbehandelt bzw. wurden mit DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung der Zellen mit den Inhibitoren für 1 h, wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1α stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Aus einem Teil der geernteten Zellen wurde die RNA isoliert, um anschließend Genexpressionsanalysen über RT-qPCR durchführen zu können. Der Rest der Zellen wurde lysiert. Die Lysate wurden für die Proteindetektion im Western Blot verwendet. Wie bereits die Analyse der Zeit- und Dosisabhängigkeit der Inhibitoren zeigte, nahm die Phosphorylierung von (S2)-Pol II durch die Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren ab (Abb. 4.6 A). Auch die Gesamtproteinmenge von Pol II wurde durch die CDK Inhibitoren reduziert. Des Weiteren zeigte die Western Blot Analyse, dass die Phosphorylierung von Rb ausschließlich reduziert war, wenn die HeLa Zellen mit dem pan-CDK Inhibitor behandelt wurden und somit CDK4/6 inhibiert wurden. Die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren für 4 h hatte keinen Einfluss auf die IL-1 induzierte Phosphorylierung bzw. die

Gesamtproteinmenge von p65. Die IL-1 Stimulation der Zellen induzierte die Degradation von I κ B α . Nach 1 h IL-1 Stimulation begann die Re-Synthese von I κ B α , so dass nach 3 h die Ausgangsproteinmenge wieder erreicht wurde. Die Re-Synthese von I κ B α wurde durch Flavopiridol supprimiert. Wurden hingegen CDK12/13 inhibiert, so war die Re-Synthese von I κ B α nicht gänzlich unterdrückt. Nach 1 h IL-1 Stimulation war die Proteinmenge von I κ B α im Vergleich zur DMSO Kontrolle reduziert. Die Re-Synthese schien lediglich verlangsamt. Der Effekt auf die Re-Synthese von I κ B α fiel verglichen zu den HCT116 Zellen (Abb. 4.2) schwächer aus. Die IL-1 induzierte Synthese des NF- κ B-Inhibitors A20 wurde durch Flavopiridol und THZ531 eingedämmt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung wurden β -Actin und Actinin detektiert. Für die Quantifizierung der Blots (Abb. 4.6 B) wurde die Chemilumineszenz-Intensität bestimmt.

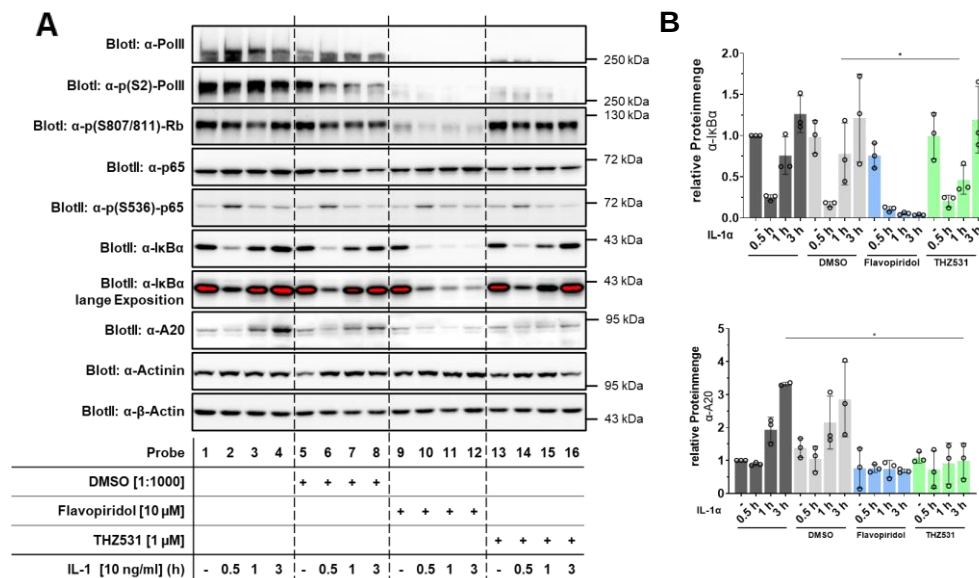


Abb. 4.6 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg in HeLa Zellen.

(A) HeLa Zellen wurden mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg in HeLa Zellen. Die Proteinmenge wurde auf die unbehandelte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$).

Die RNA der geernteten Zellen wurde für Genexpressionsanalysen isoliert. Die Ergebnisse der RT-qPCR (Abb. 4.7) zeigten, dass die pan-CDK Inhibition durch Flavopiridol auch in HeLa Zellen die Expression aller getesteten IL-1 Zielgene unterdrückte. Die selektive Inhibition von CDK12/13 zeigte hingegen differentielle Effekte auf verschiedene NF- κ B Zielgene. Die Expression von *NFKBIA* wurde nach 3 h IL-1 Stimulation signifikant induziert. Auch die Expressionen von *IL8*, *CXCL2* und *CCL20* waren nach 3 h IL-1 Stimulation im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle leicht erhöht. Hierbei handelte es sich allerdings nicht um

signifikante Effekte. Die mRNA Menge von *IL6* blieb unverändert während die Genexpression von *ICAM1* durch die CDK12/13 Inhibition stark verringert war. So ließen sich die IL-1 Zielgene in unterschiedliche Gruppen unterteilen. Insgesamt waren die beschriebenen Effekte im Vergleich zu HCT116 Zellen weniger ausgeprägt.

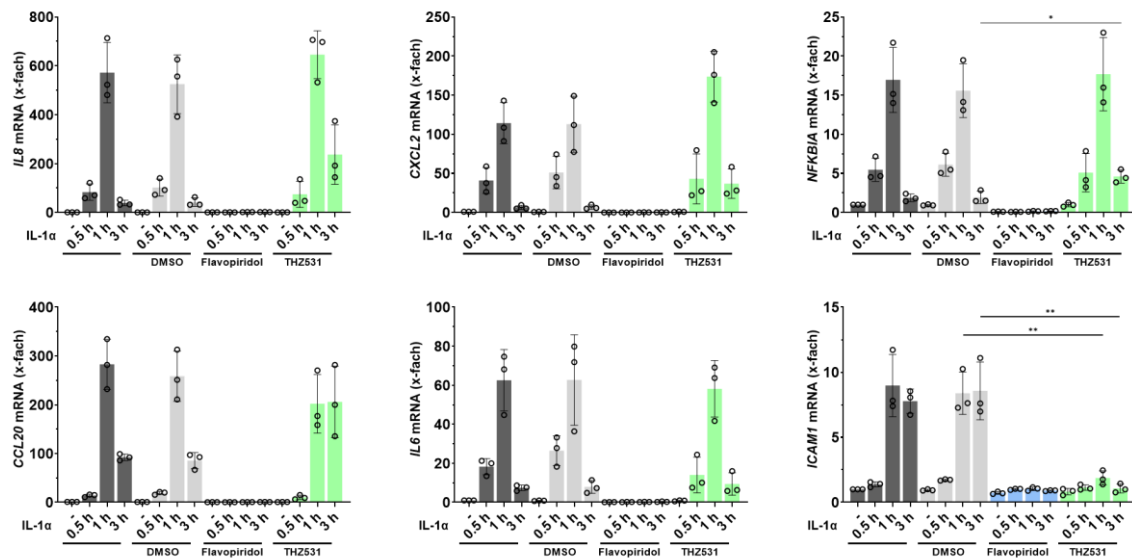


Abb. 4.7 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet. Anschließend wurde die RNA isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Für die qPCR wurden Taqman-Sonden verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen ActB und die unstimulierte Probe. Die Anzahl an unabhängigen, biologischen Replikaten betrug n=3. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung). Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Neben den Effekten auf die IL-1 vermittelte Genexpression, sollte zusätzlich der Einfluss der verschiedenen CDK Inhibitoren auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in HeLa Zellen analysiert werden. Dafür wurden HeLa Zellen mit Flavopiridol oder THZ531 behandelt. Als Kontrollen wurden weitere Zellen unbehandelt gelassen bzw. mit DMSO behandelt. Nach 1 h Inhibitorbehandlung wurden die HeLa Zellen zusätzlich für 16 h mit IL-1 stimuliert, um den Einfluss auf die IL-1 induzierte Sekretion untersuchen zu können. Die Zellkulturüberstände wurden für die Sekretomanalyse geerntet. Des Weiteren wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden als Kontrolle der Inhibitorbehandlung zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. Die gemessenen Proteinkonzentrationen der Bradford-Messung wurden zudem verwendet, um die Sekretomanalysen auf die Zellzahl zu normieren. Es wurden ELISA Experimente für IL-8, CXCL2, CCL20 und ICAM1 durchgeführt. Die absolut bestimmten Proteinkonzentrationen (Abb. 4.8) zeigten, dass Flavopiridol die IL-1 induzierte Sekretion von IL-8, CXCL2, CCL20 und ICAM1 unterdrückte. Die selektive Inhibition von CDK12/13 hatte hingegen eine stark erhöhte IL-1 induzierte Sekretion von IL-8, CXCL2 und CCL20 zur Folge. Im Gegensatz wurde die Freisetzung bzw. das *shedding* von ICAM1 durch die Inhibition von

CDK12/13 reduziert. THZ531 hatte somit einen differentiellen Effekt auf die Sekretion verschiedener Proteine. Insgesamt reflektierte die Sekretomanalyse die Genexpressionsanalyse.

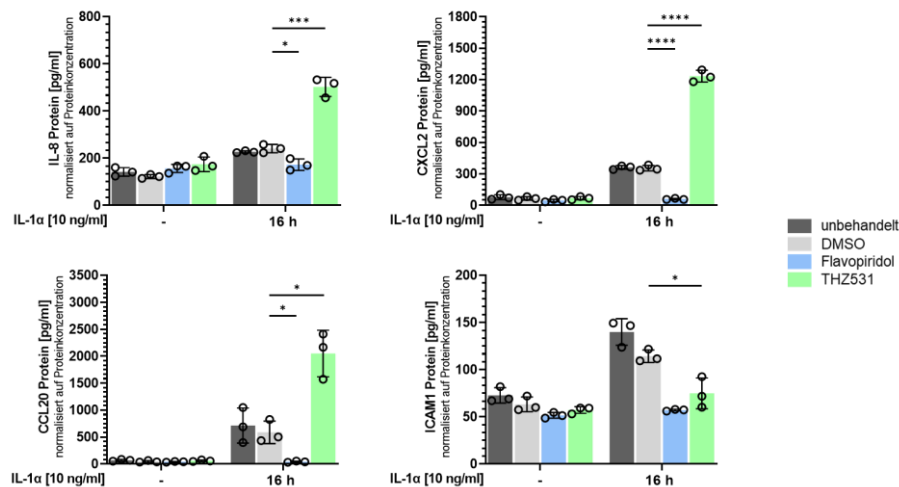


Abb. 4.8 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und in ELISA-Analysen für IL-8, CXCL2, CCL20 und ICAM1 eingesetzt. Dargestellt sind die anhand den erstellten Standardreihen berechneten Proteinkonzentrationen. Die Werte wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt ($p \leq 0.05$; **** $p \leq 0.0001$).

Die parallel zu den ELISA durchgeführte Western Blot Analyse (Abb. 4.9) zeigte, dass die Gesamtproteinmenge von Pol II und die Phosphorylierung von (S2)-Pol II sowohl durch Flavopiridol als auch durch THZ531 stark reduziert war. Die Phosphorylierung von Rb war nach der Flavopiridol-Behandlung ebenfalls stark verringert. Auch die spezifische Inhibition von CDK12/13 für insgesamt 17 h hatte eine reduzierte Phosphorylierung von Rb zur Folge. Des Weiteren deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Gesamtproteinmenge von p65 durch die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol und THZ531 für 17 h leicht reduziert war. Auch auf die IL-1 vermittelte Phosphorylierung von p65 hatten die beiden Inhibitoren einen stark supprimierenden Einfluss. Die Gesamtproteinmenge von IκBα war stark reduziert, wenn die Zellen für 17 h mit Flavopiridol behandelt wurden. Die Re-Synthese von IκBα wurde vollkommen unterdrückt. Wurden die Zellen hingegen für 17 h mit THZ531 behandelt, war die Gesamtproteinmenge von IκBα nur minimal und nicht signifikant reduziert. Nach 16 h IL-1 Stimulation konnte kein Effekt auf die Re-Synthese von IκBα gezeigt werden. Die IL-1 induzierte Synthese von A20 wurde durch beide Inhibitoren unterdrückt. Bereits unter basalen Bedingungen war die Proteinmenge von A20 reduziert. Die Detektion von β-Actin und Actinin diente dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung.

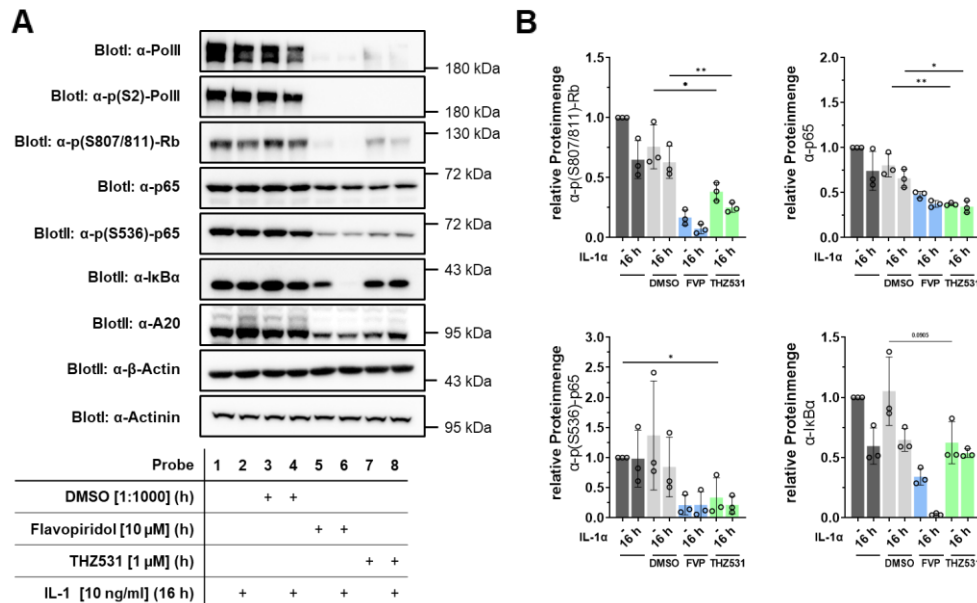


Abb. 4.9 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden mit Flavopiridol (FVP) [10 μM] oder THZ531 [1 μM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und eine Zellyse wurde durchgeführt. (A) Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg in HeLa Zellen. Die Proteinmenge wurde auf die unbehandelte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

4.1.3 Differentielle Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in Ovarialkarzinomzellen

Bei einem Ovarialkarzinom handelt es sich um eine bösartige Tumorerkrankung der Eierstöcke. Es ist der aggressivste aller gynäkologischen Krebsarten. Das *high-grade serous ovarian carcinoma* (im Deutschen *high-grade* seröses Ovarialkarzinom, HGSOC) ist dabei die häufigste (ca. 75 %) und gleichzeitig die bösartigste Form des Ovarialkarzinoms. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei lediglich 20-30 %. In 95 % aller Fälle tritt im Ovarialkarzinom eine Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* auf. Doch auch *CDK12* gehört zu einem der 10 am häufigsten mutierten Gene in HGSOC (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Aus diesem Grund war es interessant, die Rolle von *CDK12* und *CDK13* im IL-1-NF-κB Signalweg auch im Ovarialkarzinom zu untersuchen. Für diesen Zweck wurden zunächst OVCAR-4 Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um HGSOC-Zellen, die aus den Aszites einer 42-jährigen Patientin stammen. Der Tumor der Patientin war resistent gegen Cisplatin und wies eine homozygote Leu130Val Mutation von *TP53* auf.

Um den Einfluss der CDK Inhibition auf den IL-1 Signalweg in OVCAR-4 Zellen zu untersuchen, wurden der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol und der selektive *CDK12/13* Inhibitor THZ531 eingesetzt. Die OVCAR-4 Zellen wurden für 1 h mit Flavopiridol (10 μM) oder THZ531

(1 μ M) vorbehandelt. Bei weiteren Zellen wurde dem Zellkulturmedium DMSO zugesetzt. Dies diente der Lösungsmittelkontrolle. Weitere Zellen blieben unbehandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 α stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde für Western Blot Analysen lysiert. Aus den übrigen Zellen wurde die RNA für anschließende RT-qPCRs isoliert. Die Proteindetektionen mittels Western Blot sind in Abb. 4.10 dargestellt. Für die Quantifizierung der Blots (Abb. 4.10 B) wurden die Chemilumineszenz-Intensitäten der Western Blots bestimmt und die Werte auf die unbehandelte Probe normiert. Die Analysen zeigten, dass die Phosphorylierung von (S2)-Pol II durch die Behandlung der Zellen mit beiden CDK Inhibitoren reduziert war. Sowohl die pan-CDK Inhibition als auch die selektive CDK12/13 Inhibition beeinflusste somit die Phosphorylierung der CTD von Polymerase II. Die Gesamtproteinmenge von Pol II war dabei nicht betroffen. Die Phosphorylierung von Rb wurde aufgrund der Inhibition von CDK4/6 durch Flavopiridol verringert. THZ531 hatte nach 4 h keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rb. Um den Einfluss der CDK Inhibition auf den IL-1 Signalweg zu untersuchen, wurden einige Komponenten des IL-1 Signalwegs im Western Blot detektiert. Die Gesamtproteinmenge von p65 blieb jeweils unverändert. Auch auf die IL-1 induzierte Phosphorylierung der NF- κ B Untereinheit p65 hatten die beiden Inhibitoren keinen Einfluss. Der NF- κ B Inhibitor I κ B α wurde auch in den OVCAR-4 Zellen nach 0.5 h IL-1 Stimulation proteasomal degradiert und erlaubte somit die Translokation der NF- κ B Untereinheiten in den Zellkern. Nach 1 h IL-1 Stimulation begann die Re-Synthese, sodass nach 3 h Stimulation die Ausgangsproteinmenge von I κ B α in den OVCAR-4 Zellen überschritten wurde. Wurden die Zellen mit dem pan-CDK Inhibitor Flavopiridol behandelt, war die basale Menge von I κ B α im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle leicht verringert. Nach 0.5 h IL-1 Stimulation wurde I κ B α depletiert, allerdings erfolgte keine Re-Synthese. Die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol hat somit eine Unterdrückung der Re-Synthese zur Folge. Nach erfolgter Inhibition von CDK12/13 wurde I κ B α ebenfalls nach 0.5 h IL-1 Stimulation abgebaut. Nach 1 h und 3 h IL-1 Stimulation waren die Gesamtproteinmengen von I κ B α jeweils im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen reduziert. Die Re-Synthese war geschwächt. Auch bei A20 handelt es sich um einen Inhibitor von NF- κ B, welcher in den OVCAR-4 Zellen nach 1 h IL-1 Stimulation exprimiert wurde. Die Flavopiridol-Behandlung unterdrückte die IL-1 induzierte Synthese von A20, während THZ531 eine leicht verringerte oder entschleunigte Synthese verursachte. Die Haushaltsproteine β -Actin und Actinin wurden als Ladekontrollen detektiert. DMSO hatte keinen Einfluss auf die detektierten Proteinmengen.

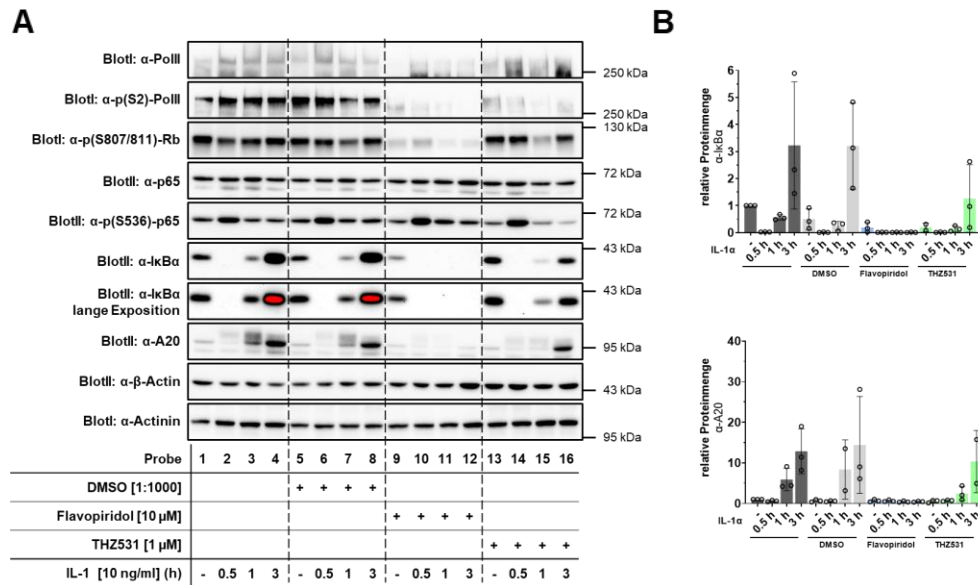


Abb. 4.10 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg in OVCAR-4 Zellen.

(A) OVCAR-4 Zellen wurden mit Flavopiridol [10 μM] oder THZ531 [1 μM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg in OVCAR-4 Zellen. Die Proteinmenge wurde auf die unbehandelte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt.

Wie beschrieben, wurden parallel zur Western Blot Analyse Zellen für Genexpressionsanalysen (Abb. 4.11) geerntet. Die IL-1 Stimulation induzierte die Expression der getesteten Gene in OVCAR-4 Zellen. Beispielsweise wurde die Expression der Gene *IL8*, *CXCL2* und *CCL20* induziert, welche für Zytokine codieren. Auch die Expression von *ICAM1* (ein Zelladhäsionsmolekül) und *NFKBIA* (codierend für IκBα) wurde induziert. Damit ist die IL-1 Responsivität der OVCAR-4 Zellen vergleichbar mit der der HCT116 und HeLa Zellen und die IL-1 abhängigen Effekte sind in unterschiedlichen (Tumor)Zellen reproduzierbar. Die Inhibition verschiedener CDKs durch Flavopiridol unterdrückte die Expression aller gemessenen IL-1 Zielgene. Flavopiridol hatte somit auch in OVCAR-4 Zellen einen starken supprimierenden Effekt auf die IL-1 induzierte Genexpression. Die Inhibition von CDK12/13 hatte wiederum eine verstärkte Expression der Zytokingene *IL8* und *CXCL2* nach 3 h IL-1 Stimulation zur Folge, wobei der Effekt auf *IL8* moderat ausfiel bzw. nicht signifikant war. Auch die mRNA Menge von *NFKBIA* war durch THZ531 nach 3 h IL-1 Stimulation im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen erhöht. Im Gegensatz dazu waren die mRNA Mengen von *ICAM1* und *BIRC3* nach 1 h und 3 h IL-1 Stimulation stark reduziert. Diese differentiellen Effekte der CDK12/13 Inhibition auf die IL-1 induzierte Genexpression stimmten damit mit den in HCT116 und HeLa Zellen beobachteten Phänotypen überein.

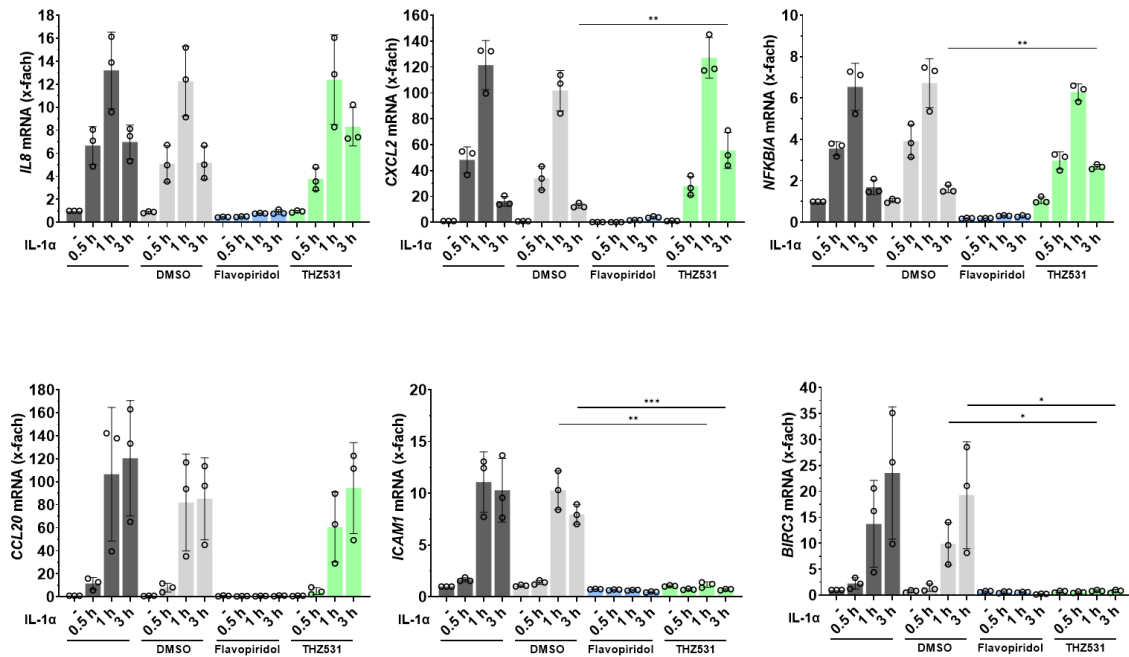


Abb. 4.11 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in OVCAR-4 Zellen. OVCAR-4 Zellen wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Die RNA wurde isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Es wurden sowohl Taqman-qPCRs (*ActB*, *IL8*, *CXCL2*, *NFKB1A*, *CCL20* und *ICAM1*) als auch qPCRs mittels SYBR Green Assay (*ActB*, *BIRC3*) durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta$ Ct-Methode verwendet. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen *ActB* und die unstimulierte Probe. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Bis vor einigen Jahren wurde davon ausgegangen, dass das HGSOC direkt im Epithelium der Eierstöcke entsteht. Doch zunehmende Evidenz zeigt, dass das HGSOC in vielen Fällen seinen Ursprung im Epithelium der Eileiter hat (Labidi-Galy et al., 2017). Aus diesem Grund war es interessant, Eileiter-Zellen im Zusammenhang mit der CDK Inhibition genauer zu untersuchen. In der Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz (JLU) wurde dafür ein HGSOC Modell aus Eileiter-Zellen entwickelt. Die Etablierung dieser Zelllinie basierte auf den Arbeiten von Karst and Drapkin, 2011 (Karst et al., 2011). Einer gesunden Person wurde über eine prophylaktische Salpingektomie ein Eileiter entfernt. Die Zellen aus den Eileiter Fimbriae wurden extrahiert und kultiviert. Letztendlich wurden Zellen selektiert, welche einen sekretorischen Phänotyp aufwiesen. Hierbei handelt es sich um die sogenannten *fallopian tube secretory epithelial cells* (FTSEC). Die FTSECs wurden über die Expression von *hTERT*, einem shRNA vermittelten *knockdown* des Tumorsuppressors p53 und der Expression einer aktivierenden Mutante von CDK4 (R24C) immortalisiert. Die immortalisierten FTSECs (iFTSECs) waren kommerziell erhältlich (Abb. 4.12). In der Arbeitsgruppe Schmitz wurden die erworbenen Zellen schließlich zu Krebszellen transformiert. Für die Transformation wurde ein duales, lentivirales System verwendet. Die Transformation wurde durch die Überexpression von Myc und die Expression einer *gain-of-function* Mutante von KRAS (G12V)

(iFTSECs+mutKRAS/Myc) erzielt (Abb. 4.12). Die KRAS Mutation spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalwegen, welche in vielen HGSOC Patienten dereguliert sind. Bei c-Myc handelt es sich um ein gut charakterisiertes Onkogen, welches in 35 % aller HGSOC Fällen überexprimiert ist (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Zusätzlich wurden Zellen als Kontrolle der lentiviralen Transduktion mit einem Leervektor transduziert (iFTSECs+Leervektor). Viele Ergebnisse aus der Doktorarbeit von Jan Dreute (Dreute, 2023) zeigen, dass die Transformation der Zellen erfolgreich war. Die Zellen erlaubten einen direkten Vergleich zwischen gesunden Zellen und transformierten Krebszellen.

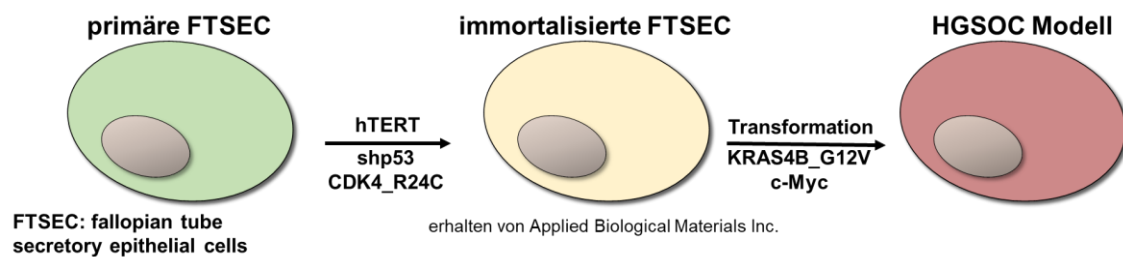


Abb. 4.12 Generierung eines HGSOC Modells durch sequentielle Immortalisierung und Transformation von primären Zellen des humanen Eileiters.

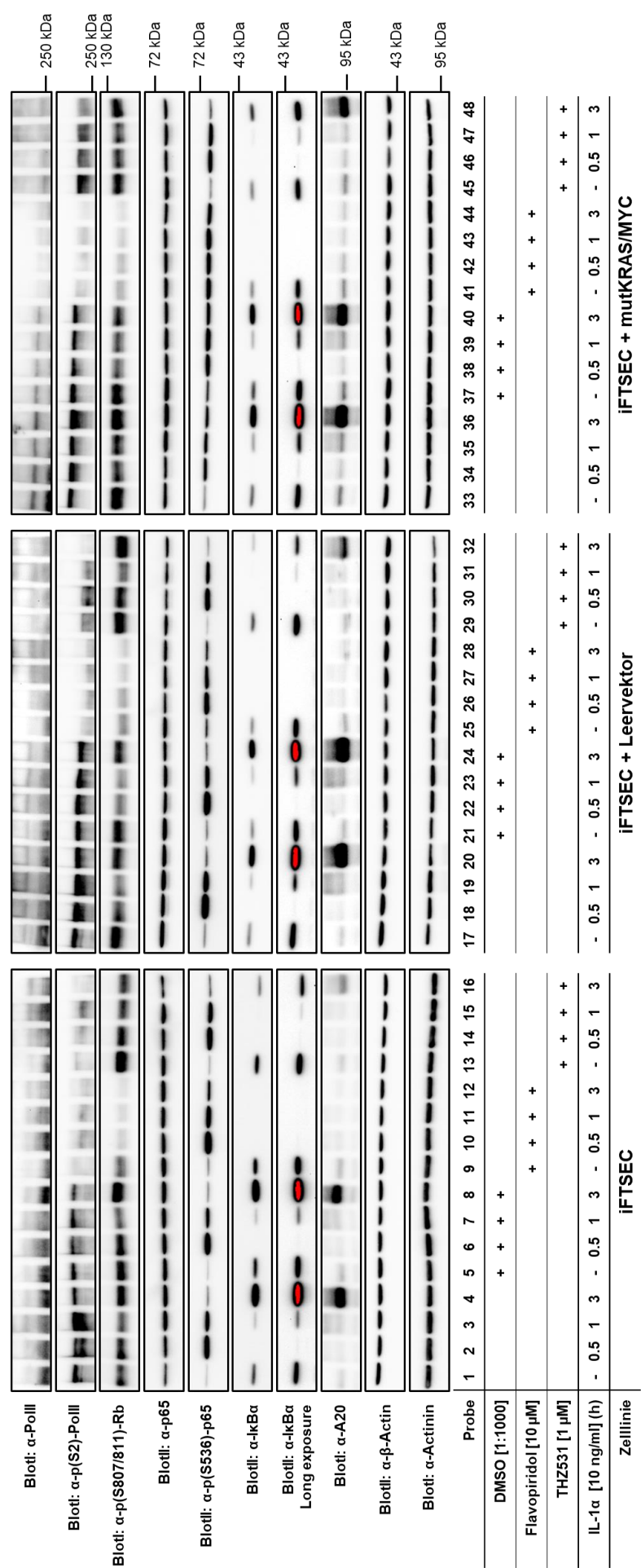
Fallopian tube secretory epithelial cells (FTSECs) wurden über *hTERT*, *shp53* und eine aktivierende Mutation von *CDK4* (R24C) immortalisiert. Anschließend wurden die Zellen über die Überexpression von *Myc* und die Expression einer *gain-of-function* Mutante von *KRAS* (G12V) zu Krebszellen transformiert (Dreute, 2023).

Wie zuvor, sollte unter Verwendung dieses HGSOC Modells der Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 induzierte Genexpression untersucht werden. Hierfür wurden iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc für 1 h mit den jeweiligen Inhibitoren vorbehandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h und 3 h mit IL-1 stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde für die Proteindetektion im Western Blot lysiert. Der zweite Teil wurde verwendet, um die RNA aus den Zellen zu isolieren. Anschließend wurde eine reverse Transkription durchgeführt und die Expression verschiedener Gene über RT-qPCR analysiert.

Die Effekte der Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg wurden mittels Western Blot (Abb. 4.13) analysiert. Diese Analysen zeigten, dass die Gesamtproteinmenge von Pol II durch beide Inhibitoren in iFTSECs und iFTSECs+Leervektor nicht beeinflusst wurde. Lediglich in den iFTSECs+mutKRAS/Myc war die Pol II Gesamtproteinmenge durch Flavopiridol reduziert. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass die Phosphorylierung von Pol II an Ser2 durch die Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren reduziert war. Dabei hatte Flavopiridol in allen drei Zelllinien einen stärkeren Effekt auf die (S2)-Pol II-Phosphorylierung als THZ531. Des Weiteren deuteten die Western Blot Analysen darauf hin, dass die Verminderung der Phosphorylierung von (S2)-Pol II durch THZ531 verstärkt in iFTSECs und iFTSECs+Leervektor auftrat. In den iFTSECs+mutKRAS war die Reduktion moderat. Im

Vergleich zu den bereits untersuchten Zelllinien (HCT116, HeLa, OVCAR-4), war der Effekt von THZ531 in diesen Zelllinien gering. Die Phosphorylierung von Rb wurde lediglich reduziert, wenn eine Inhibition der Zellzyklus-assoziierten CDKs durch Flavopiridol stattgefunden hatte. Hier zeigten alle drei Zelllinien ein gleiches Verhalten. Auf die Gesamtproteinmenge von p65 hatte kein Inhibitor in keiner der Zellen einen Einfluss. Auch die IL-1 induzierte Phosphorylierung von p65 an Serin536 blieb durch beide Inhibitoren weitestgehend unverändert. Lediglich in den iFTSECs+mutKRAS/Myc führte die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol zu einer länger anhaltenden Phosphorylierung. In allen drei biologischen Replikaten war die p65-Phosphorylierung nach 3 h IL-1 Stimulation noch nicht abgeklungen, wie es im Vergleich zu unbehandelten Zellen der Fall war (Abb. 4.13 B). Nach 0.5 h IL-1 Stimulation wurde I κ B α auch in iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc degradiert. Nach 1 h IL-1 Stimulation wurde gezeigt, dass die I κ B α Proteinmenge zunimmt, während nach 3 h Stimulation die Ausgangsproteinmenge überschritten wurde. Es fand somit eine schnelle und starke Re-Synthese von I κ B α in allen drei Zelllinien statt. Flavopiridol zeigte für alle drei Zelllinien denselben Effekt. Die Re-Synthese von I κ B α wurde durch diesen Inhibitor nahezu vollständig supprimiert. Die selektive Inhibition von CDK12/13 führte hingegen zu einer deutlich reduzierten Re-Synthese von I κ B α . Nach 3 h IL-1 Stimulation war die I κ B α -Menge in allen Zelllinien im Vergleich zu unbehandelten bzw. DMSO behandelten Zellen deutlich reduziert. Allerdings schien dieser Effekt in den iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu den nicht-transformierten Zellen schwächer auszufallen. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde die Ausgangsproteinmenge von I κ B α nach 3 h IL-1 Stimulation bereits wieder erreicht. Die IL-1 induzierte Synthese von A20, einem zweiten Inhibitor des NF- κ B Signalwegs (neben I κ B α), wurde ebenfalls durch Flavopiridol in allen drei Zelllinien unterdrückt. Die Behandlung der Zellen mit THZ531 führte zu einer reduzierten Synthese von A20 in den nicht-transformierten Zellen nach 3 h IL-1 Stimulation. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc konnte wiederum kein Effekt auf die IL-1 vermittelte Proteinexpression von A20 gezeigt werden. Insgesamt fielen somit die beobachteten Effekte in den HGSOc-Zellen im Vergleich zu iFTSECs+Leervektor, HCT116, HeLa und OVCAR-4 Zellen geringer aus. Die Detektion der Proteine Actinin und β -Actin diente jeweils dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung. Für die Quantifizierung (Abb. 4.13 B) wurden die Intensitäten der Chemilumineszenzen der Blots bestimmt. Die Werte wurden auf die unbehandelten Proben der jeweiligen Zelllinie normiert.

A



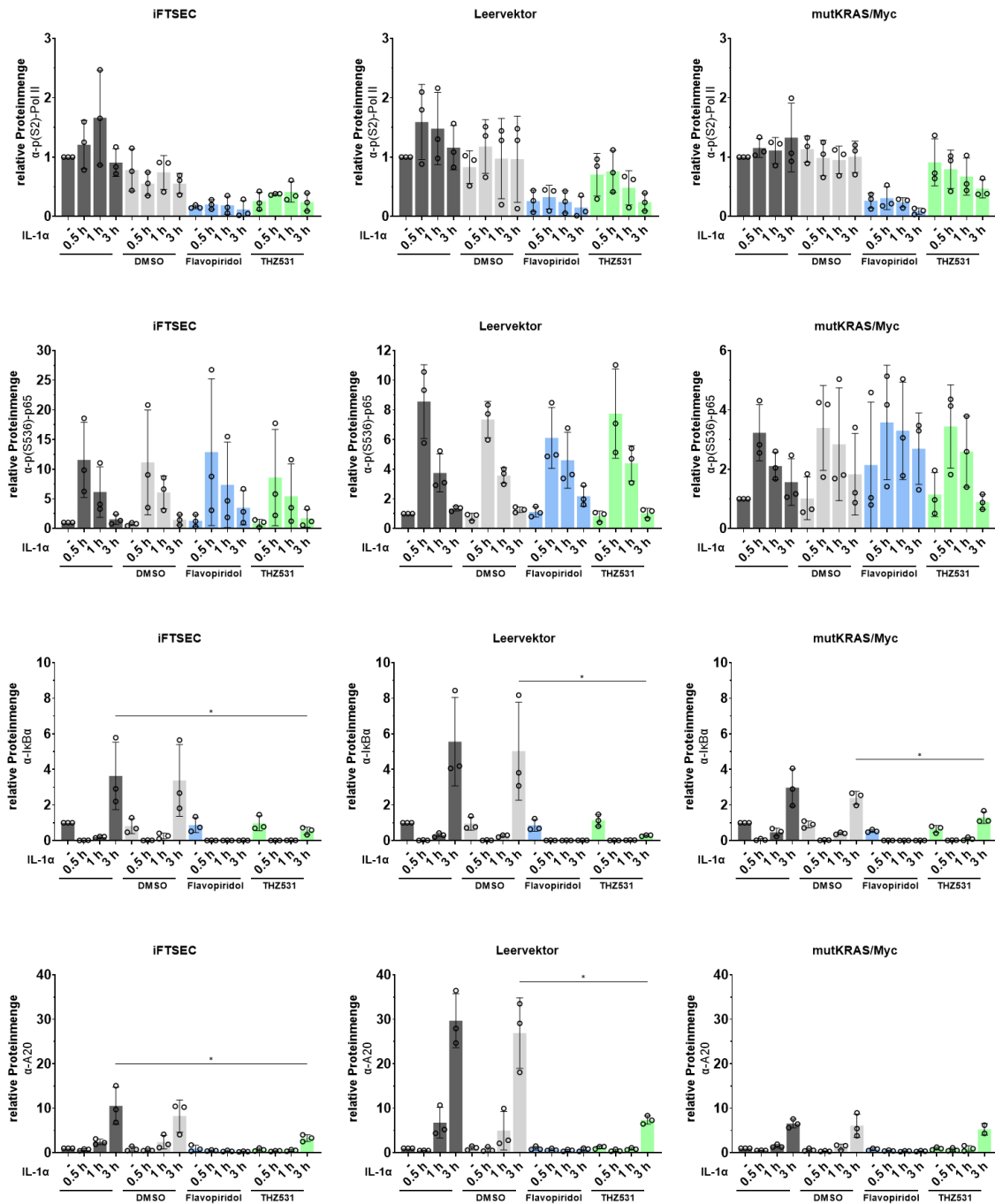
B

Abb. 4.13 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg von transformierten iFTSECs.

(A) iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg in iFTSECs. Die Proteinmenge wurde auf die unbehandelte Probe der jeweiligen Zelllinie normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$).

Für die Genexpressionsanalysen wurden die Transkriptmengen verschiedener Gene unter Verwendung der RT-qPCR ermittelt. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Dabei wurden alle Werte auf das Haushaltsgen ActB und die unbehandelte Probe der iFTSECs normiert (Abb. 4.14). Die mRNA Mengen einiger Zytokingene (*IL8*, *CXCL2*, *CCL20* und *IL6*) wurde bestimmt. Aber auch die relativen mRNA Mengen von *NFKBIA*, codierend für I κ B α , und *ICAM1*, codierend für ein Adhäsionsmolekül, wurden ermittelt. Insgesamt zeigten die Daten, dass auch diese Zelllinien die charakteristische IL-1 Responsivität aufwiesen. Die Genexpression aller gemessenen Gene wurde durch die IL-1 Stimulation induziert. DMSO hatte keinen Einfluss auf die Expression der IL-1 Zielgene. Es wurde beobachtet, dass die mRNA Mengen einiger Gene, einschließlich *NFKBIA*, *CCL20*, und *ICAM1*, in den iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu den nicht-transformierten Zellen verringert war (Abb. 4.14). Die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol hatte eine nahezu vollständige Suppression der IL-1 induzierten Expression aller Zielgene in allen drei Zelllinien zur Folge. Es konnte kein Unterschied zwischen nicht-transformierten Zellen und transformierten Zellen beobachtet werden. Hingegen konnte gezeigt werden, dass THZ531 einen differentiellen Effekt auf verschiedene Gengruppen aufwies. Die mRNA Mengen von *CXCL2* und *NFKBIA* waren durch die CDK12/13 Inhibition nach 1 h IL-1 Stimulation in den nicht-transformierten Zellen verringert. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde nach 1 h IL-1 Stimulation keine Veränderung beobachtet. Im Kontrast war die Expression von *CXCL2* und *NFKBIA* nach 3 h IL-1 Stimulation im Vergleich zu den unbehandelten bzw. DMSO behandelten Kontrollen erhöht. Dies trat auch für die transformierten Krebszellen ein, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Auch die mRNA Menge von *CCL20* stieg nach 3 h IL-1 Stimulation in den iFTSECs und den iFTSECs+Leervektor verglichen zu den unbehandelten Kontrollen an. Für die iFTSECs+mutKRAS/Myc blieb die *CCL20* Expression unverändert. Die Expression von *IL8* war in allen Zelllinien durch THZ531 gleichbleibend. Im Gegensatz nahm die mRNA Menge von *ICAM1* im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen stark ab. Insgesamt konnte aus den Ergebnissen somit geschlossen werden, dass die CDK12/13 Inhibition in iFTSECs differentielle Effekte auf das Spektrum basal exprimierter und induzierter Gene hatte. Diese Effekte waren allerdings in den iFTSECs+mutKRAS/Myc schwächer ausgeprägt, was erste Hinweise gab, dass die transformierten Krebszellen die CDK12/13 Inhibition umgehen können.

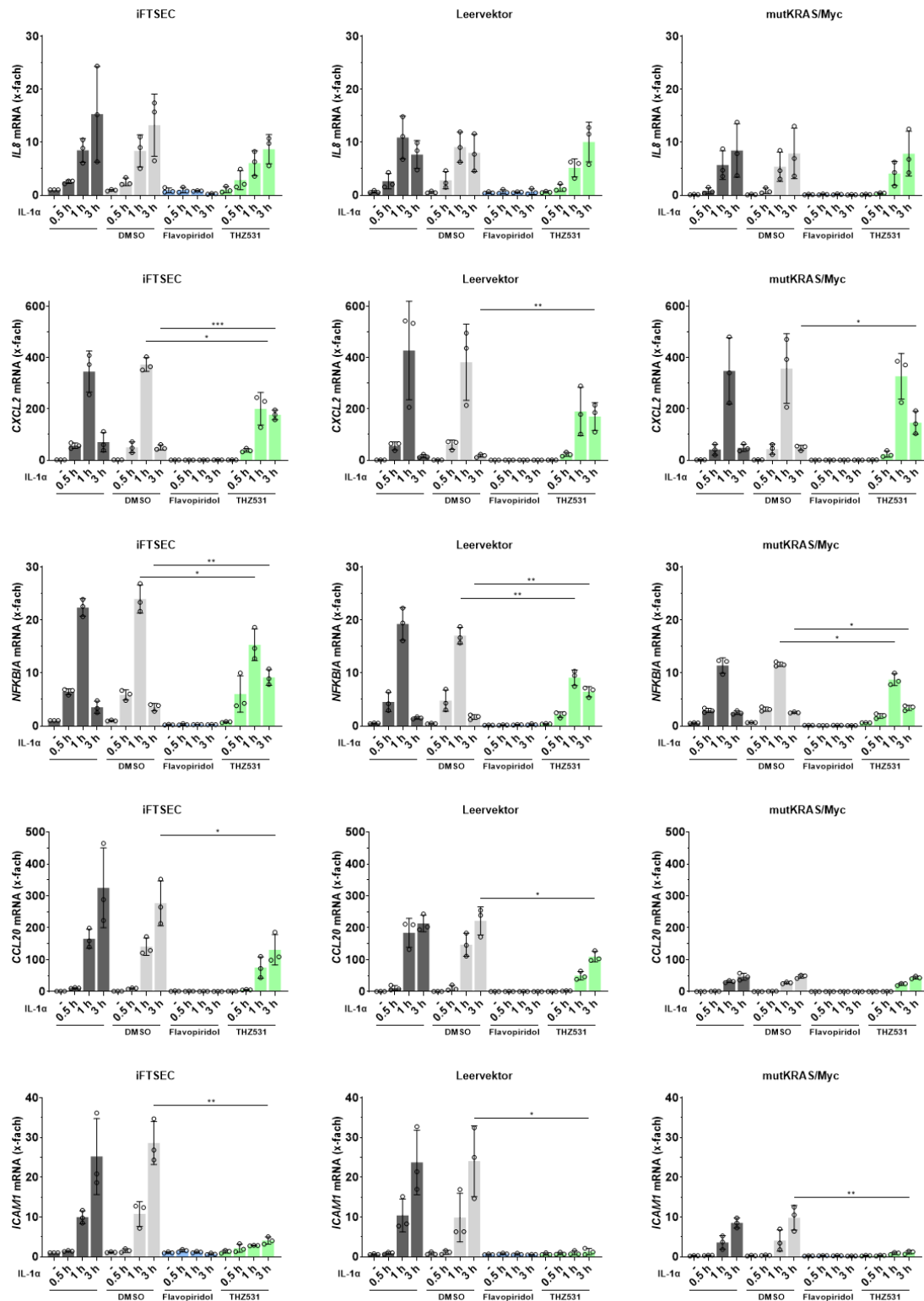


Abb. 4.14 Differentielle Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in transformierten iFTSECs.

iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen zusätzlich für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen geerntet, die RNA wurde isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Es wurden Taqman-Sonden für die qPCR verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen ActB und die unstimulierte Probe der iFTSECs. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Zusätzlich zu den RT-qPCRs selektierter Gene, sollte eine transkriptomweite Analyse mittels RNASeq durchgeführt werden. iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol, THZ531 oder DMSO vorbehandelt. Ein Teil der Zellen blieb außerdem unbehandelt. Daraufhin wurden Zellen für 1 h oder für 3 h mit IL-1 stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellen wurden anschließend geerntet. Die RNA wurde isoliert und zur Sequenzierung gesendet. Die Sequenzierung wurde von der Firma Novogene durchgeführt. Dabei wurde die RNA aus drei unabhängigen, biologischen Experimenten verwendet. Novogene führte eine polyA-Anreicherung durch, so dass lediglich *messenger* RNAs sequenziert wurden. Des Weiteren wurde die DESeq2 Auswertung der Daten von Novogene vorgenommen. Hierbei handelt es sich um eine sehr gut etablierte und häufig angewandte Analyse zur differentiellen Genexpression (Love et al., 2014). Die DESeq2 Analyse von Novogene bestand aus drei Schritten. In einem ersten Schritt wurden die *read counts* normalisiert. Im Anschluss fand eine Model-abhängige Einschätzung der P-Werte statt, so dass im Anschluss die Falscherkennungsrate (FDR) bestimmt werden konnte. Für die Auswertung der Daten unsererseits wurden die ermittelten $\log_2$ *fold changes* ($\log_2$ FC) und P-Werte (P) verwendet. Hierbei lagen die Kriterien für die Genexpressionsanalyse bei einem $\log_2$ FC ≥ 2 oder $\log_2$ FC ≤ -2 . Dies bedeutet, dass mindestens eine vierfache Regulierung der Gene stattgefunden haben muss. Des Weiteren sollte der P-Wert stets $P \leq 0.05$ sein.

Um einen ersten Überblick über die Daten zu bekommen, wurde der Transformationseinfluss der iFTSECs+mutKRAS/Myc genauer analysiert (Abb. 4.15 A). Die Transformation der Zellen hatte einen großen Effekt auf das Genexpressionsprofil der Zellen. Insgesamt waren in iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu den iFTSECs+Leervektor 2342 Gene mindestens vierfach dereguliert. Dabei wurden 1112 Gene hochreguliert und 1212 Gene herunterreguliert. Dies wies darauf hin, dass die Überexpression von Myc und die Expression der KRAS-Mutante einen deutlichen Einfluss auf die basale Genexpression hatten. Die Expression von CDK12 und CDK13 wurde durch die Transformation allerdings nicht beeinflusst (Abb. 8.1). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Transformation der Zellen auf die IL-1 Responsivität hat, wurden zusätzliche Analysen durchgeführt. Die Auswertung der Daten (Abb. 4.15 B und C) zeigte, dass in den Leervektor-Zellen die Expression von 392 Genen nach 3 h IL-1 Stimulation mindestens vierfach induziert wurde. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden hingegen nur 199 Gene nach dreistündiger IL-1 Stimulation erhöht exprimiert. Die Überlagerung dieser Gene ($\log_2$ FC ≥ 2 und $P \leq 0.05$) mittels Venn-Diagrammen (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) zeigte (Abb. 4.15 D), dass lediglich 141 Gene in beiden Zelllinien nach 3 h IL-1 Stimulation induziert wurden. Darunter befanden sich Gene wie beispielsweise *CCL20*, *CXCL2*, *IL1B*, *CSF1*, *CCL2* und *BIRC3*. 251 Gene wurden lediglich in den Leervektor Zellen und 58 Gene ausschließlich in den mutKRAS/Myc-Zellen vierfach hochreguliert.

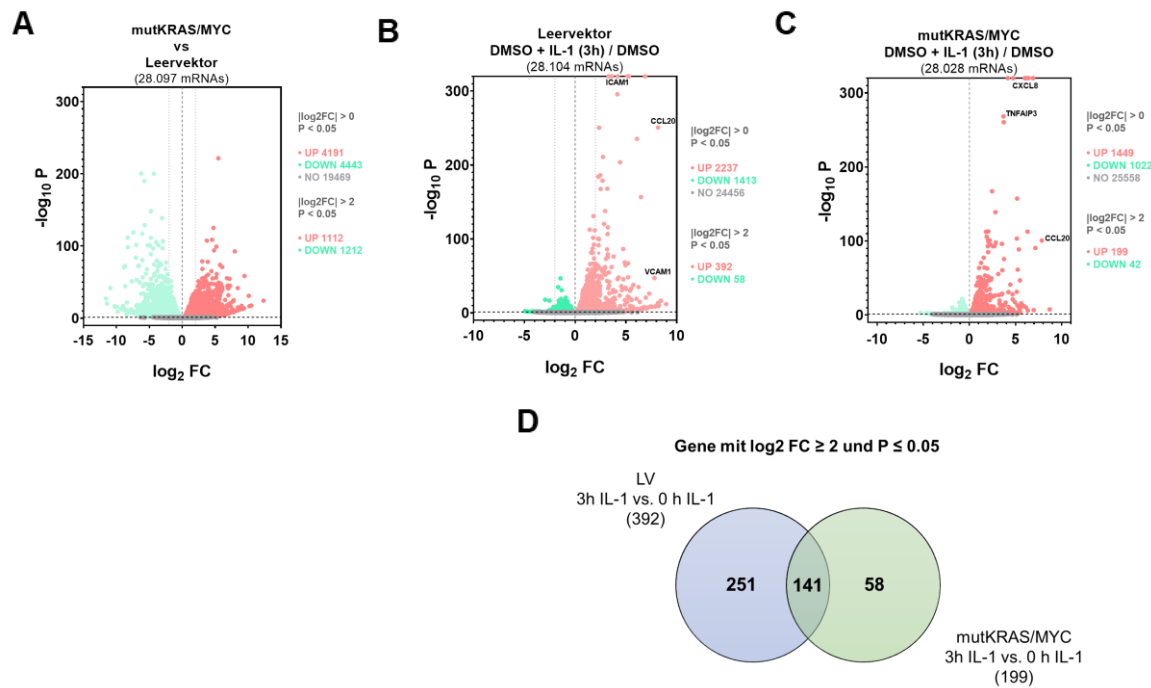


Abb. 4.15 Die Transformation der iFTSECs beeinflusst die basale und IL-1 induzierte Genexpression.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über die DESeq2 Analyse. (A-C) Vulkanplots zum Einfluss der Transformation auf die iFTSECs und die IL-1 induzierte Genexpression. Aufgetragen wurde der $\log_2 FC$ gegen $-\log_{10} P$. Herunterregulierte Gene sind in Grün und hochregulierte Gene in Rot dargestellt. (D) Venn Diagramm zum Einfluss der Transformation der iFTSECs auf die IL-1 induzierte Genexpression. In die Analyse einbezogen wurden Transkripte, welche innerhalb folgender Filterung bei einem Vergleich mit der unstimulierten Probe lagen: $\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$.

Eine Anreicherungsanalyse über Metascape wurde durchgeführt (Zhou et al., 2019), um biologische Kategorien bzw. Prozesse (*gene ontology terms* oder spezifische *pathways*) zu identifizieren, in denen die IL-1 induzierten Gene eine wichtige Rolle spielen. Außerdem sollten Unterschiede zwischen den Zelllinien auf *pathway* Ebene ermittelt werden. Für die Analyse wurden Transkripte einbezogen, welche mindestens vierfach nach 1 h oder 3 h IL-1 Stimulation hochreguliert wurden ($\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$). Die TOP 100 angereicherten Prozesse sind in Abb. 4.16 dargestellt. Die Metascape-Analyse zeigte, dass Prozesse wie beispielsweise *cytokine signaling in immune system* (R-HSA-1280215), *interleukin-10 signaling* (R-HSA-6783783), *response to lipopolysaccharide* (GO:0032496) und *secretion by cell* (GO:0032940) in beiden Zelllinien verstärkt angereichert wurden. 76 verschiedene Prozesse wurden in beiden Zelllinien zu beiden Zeitpunkten angereichert (Abb. 4.16 B). Insgesamt wurden unter den TOP 100 Prozessen nur wenige Unterschiede zwischen den Zelllinien festgestellt. Der *P53 downstream pathway* (M145) wurde zum Beispiel in den Leervektor-Zellen ausschließlich nach 1 h IL-1 Stimulation angereichert. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde dieser Prozess erst nach 3 h IL-1 Stimulation angereichert. Weitere Prozesse, welche in den Leervektor-Zellen bereits nach 1 h IL-1 Stimulation (und ebenfalls nach 3 h IL-1 Stimulation) angereichert wurden, aber in den

iFTSECs+mutKRAS/Myc erst nach 3 h IL-1 Stimulation waren *interleukin-12 production* (GO:0032615), *immature T cell proliferation* (GO:0033079), *regulation of response to cytokine stimulus* (GO:0060759) und *positive regulation of interleukin-10 production* (GO:0032733). Als Komponenten dieser Prozesse wurden Gene wie beispielsweise *IL6*, *TLR2*, *IRAK2*, *TNFAIP3* (codierend für A20), *IL1R* und *CCL5* identifiziert. Sechs Prozesse wurden außerdem in den Leervektor-Zellen angereichert, aber in den transformierten Krebszellen nicht. Zu diesen gehörten beispielsweise *PID IL4 2 PATHWAY* (M28), *DNA damage response (only ATM dependent)* (WP710) und *interferon signaling* (R-HSA-913531). Gene aus dem *interferon signaling* sind beispielsweise Gene, welche für die Adhäsionsmoleküle ICAM1 und VCAM1 codieren. Des Weiteren wurde Gene identifiziert, welche eine wichtige Rolle im Interferon-Signalweg spielen, wie zum Beispiel die *interferon induced proteins with tetratricopeptide repeats* (*IFIT2*, *IFIT3*) der *interferon regulatory factor 1* (*IRF1*) und der *interferon gamma receptor 2* (*IFNGR2*). Es wurde somit gezeigt, dass diese Gene durch die IL-1 Stimulation in iFTSECs+Leervektor mindestens vierfach hochreguliert wurden, in mutKRAS/Myc Zellen allerdings nicht. Insgesamt wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die IL-1 Responsivität in den transformierten Krebszellen gegenüber der Leervektor-Zellen abgeschwächt oder verzögert war.

A

GO	Beschreibung	-log10(P)			
		empty vector		mutKRAS/Myc	
		1 h IL-1	3 h IL-1	1 h IL-1	3 h IL-1
		vs 0h IL-1			
GO:1902532	PID P53 DOWNSTREAM PATHWAY	10.21			2.14
M145	negative regulation of intracellular signal transduction	7.32		3.43	4.97
WP560	TGF-beta receptor signaling	5.80	2.48	3.05	
M290	PID IL12 STAT4 PATHWAY	3.00	2.33	5.46	
GO:0035914	skeletal muscle cell differentiation	6.71		4.17	
M235	PID TCR CALCIUM PATHWAY	4.59		7.52	
GO:0002831	regulation of response to biotic stimulus	5.67	6.30	4.94	4.80
GO:0019079	viral genome replication	2.87	6.79	4.16	5.04
M54	PID IL12 2PATHWAY	3.22	7.73	7.28	4.60
GO:0032940	secretion by cell	3.87	8.05	2.36	4.39
GO:0051924	regulation of calcium ion transport	2.28	6.18	2.83	5.75
WP236	Adipogenesis	4.74	4.09	3.05	2.21
GO:0061061	muscle structure development	5.60	4.24	4.37	2.51
GO:0008015	blood circulation	3.43	6.15	2.18	2.62
GO:0045833	negative regulation of lipid metabolic process	2.43	3.96	3.46	2.59
GO:0032732	positive regulation of interleukin-1 production	4.04	3.90	4.02	4.26
GO:0043433	negative regulation of DNA-binding transcription factor activity	4.67	3.78	4.50	5.01
GO:0001659	temperature homeostasis	4.87	3.25	5.78	4.25
GO:0030099	myeloid cell differentiation	5.28	3.60	4.44	5.76
GO:1901552	response to peptide	5.43	3.42	5.21	7.55
GO:0032623	interleukin-2 production	5.62	5.38	5.74	5.89
GO:0072539	T-helper 17 cell differentiation	4.53	4.91	5.64	4.71
WP2328	Allograft Rejection	3.63	4.34	4.97	4.97
GO:0009612	response to mechanical stimulus	5.06	4.67	5.16	3.67
GO:0051851	modulation by host of symbiont process	5.71	3.36	4.36	3.45
GO:1901214	regulation of neuron death	5.28	6.09	6.00	3.36
ko05202	Transcriptional misregulation in cancer	8.83	4.62	5.69	7.14
WP2865	IL1 and megakaryocytes in obesity	6.39	5.24	5.90	6.62
GO:0050673	epithelial cell proliferation	4.60	5.78	4.81	7.45
WP3888	VEGFA-VEGFR2 signaling pathway	6.95	3.05	5.77	6.73
WP2882	Nuclear receptors meta-pathway	8.74	4.35	8.08	8.41
WP69	T-cell receptor (TCR) signaling pathway	9.57	5.24	7.71	6.10
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	4.10	2.80	7.25	4.58
GO:0010035	response to inorganic substance	6.19	2.89	7.35	6.83
GO:0071774	response to fibroblast growth factor	6.07	2.75	4.34	2.34
GO:0043534	blood vessel endothelial cell migration	5.77	2.54	3.55	2.50
WP2374	Oncostatin M signaling pathway	5.46	2.28	5.61	3.30
GO:0051384	response to glucocorticoid	5.38	2.98	5.04	3.73
WP469	RAS and bradykinin pathways in COVID-19	4.53	7.75	3.95	3.26
GO:0001818	negative regulation of cytokine production	7.22	6.46	3.76	4.45
GO:0010942	positive regulation of cell death	10.32	6.05	5.27	3.15
GO:0043491	protein kinase B signaling	6.07	3.35	2.30	6.50
GO:0009611	response to wounding	5.70	5.67	2.04	7.06
GO:0045596	negative regulation of cell differentiation	6.55	6.45	4.87	6.53
GO:0048560	regulation of smooth muscle cell proliferation	6.70	8.06	5.69	8.23
WP4136	Fibrin complement receptor 3 signaling pathway	6.52	7.74	4.89	6.80
GO:0032635	interleukin-6 production	6.02	9.53	5.94	13.56
R-HSA-5668541	TNFR2 non-canonical NF-kB pathway	4.37	10.18	4.68	8.22
GO:0001934	positive regulation of protein phosphorylation	7.52	10.19	4.61	9.09
WP2203	Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) signaling pathway	4.97	6.22	4.78	8.12
GO:0048871	multicellular organismal homeostasis	4.06	6.18	5.19	6.72
GO:0052548	regulation of endopeptidase activity	4.73	7.29	4.06	6.78
GO:0045123	cellular extravasation	5.28	7.21	4.07	5.54
GO:0014015	positive regulation of gliogenesis	5.46	7.49	5.61	5.73
WP4304	Oligodendrocyte specification and differentiation	5.89	7.53	7.29	9.47
WP5092	Interactions of natural killer cells in pancreatic cancer	4.59	6.38	7.52	9.81
GO:0002274	myeloid leukocyte activation	4.32	10.39	7.28	9.33
GO:0009615	response to virus	3.97	15.29	6.46	7.66
GO:0001568	blood vessel development	11.70	10.98	9.39	8.71
WP5087	Malignant pleural mesothelioma	6.28	13.64	6.82	9.49
WP231	TNF-alpha signaling pathway	10.78	6.14	9.09	8.54
hsa05166	HTLV-I infection	8.09	9.47	6.80	4.85
GO:0045765	regulation of angiogenesis	6.59	6.72	7.79	5.41
WP4478	LTF danger signal response pathway	6.91	9.02	8.32	9.01
WP530	Cytokines and inflammatory response	9.74	14.98	11.72	13.93
WP1449	Regulation of toll-like receptor signaling pathway	8.73	10.33	10.34	13.05
GO:0002819	regulation of adaptive immune response	9.87	11.91	10.68	8.16
GO:0002521	leukocyte differentiation	12.31	17.67	12.81	14.29
GO:0031347	regulation of defense response	10.23	17.37	13.94	18.86
GO:0051990	regulation of DNA-binding transcription factor activity	9.48	12.53	8.72	13.18
GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	9.91	10.47	7.37	10.33
GO:0050731	positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	7.43	13.60	5.48	10.16
GO:0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	6.69	8.83	6.46	12.38
M167	PID APL1 PATHWAY	13.77	5.03	8.51	5.58
M60	PID NFAT TFPATHWAY	12.77	5.11	15.64	5.29
WP5094	Orexin receptor pathway	21.52	6.06	15.97	8.92
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	26.22	30.00	26.21	29.07
R-HSA-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	21.73	40.48	25.84	31.33
ko04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	21.40	42.23	24.07	33.92
WP3617	Photodynamic therapy-induced NF-kB survival signaling	21.82	20.35	19.04	29.08
GO:0030155	regulation of cell adhesion	18.10	23.76	13.50	21.65
R-HSA-6783783	Interleukin-10 signaling	17.83	26.89	25.99	28.40
WP2848	Pluripotent stem cell differentiation pathway		4.95		5.15
GO:0048732	gland development		5.93		3.75
GO:1905517	macrophage migration		4.60		6.21
M3468	NABA ECM REGULATORS		4.29		9.03
	Interactions between immune cells and microRNAs in tumor microenvironment		5.42	3.52	5.55
WP4559	interleukin-12 production	4.38	6.53		3.40
GO:0033079	immature T cell proliferation	4.31	5.24		4.45
GO:0050866	negative regulation of cell activation	6.09	8.08		7.54
GO:0032733	positive regulation of interleukin-10 production	3.92	6.64		8.56
GO:0060759	regulation of response to cytokine stimulus	2.47	6.76		5.44
GO:0042113	B cell activation	2.31	5.49		2.56
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	3.79	2.91		2.54
M28	PID IL4 2PATHWAY	2.13	5.29		
GO:0043114	regulation of vascular permeability	2.51	6.22		
GO:0007369	gastrulation	3.79	2.43		
GO:0042487	regulation of odontogenesis of dentin-containing tooth		5.61		
WP710	DNA damage response (only ATM dependent)		3.64		
R-HSA-913531	Interferon Signaling		10.30		

B

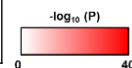
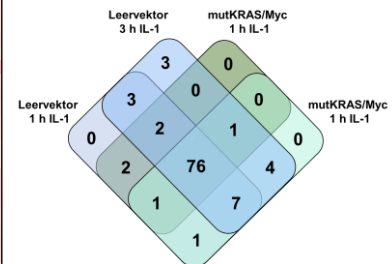


Abb. 4.16 Anreicherungsanalyse mittels Metascape zur IL-1 induzierten Genexpression in transformierten iFTSECs.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über die DESeq2 Analyse. (A) Metascapeanalysen von Transkripten, welche nach 1 h bzw. 3 h IL-1 Stimulation in iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu 0 h IL-1 Stimulation hochreguliert wurden, wurden durchgeführt. Die Transkripte mussten folgende Kriterien erfüllen: $\log_2$ FC $\geq$ 2 und $P \leq 0.05$. In der heatmap wurden $-\log_{10}$ P Werte der Überrepräsentationsanalyse dargestellt. Gezeigt sind die TOP100 angereicherten pathways. (B) Venn-Diagramm der TOP 100 angereicherten pathways pro Bedingung.

In einem zweiten Schritt wurden die Auswirkungen von Flavopiridol und THZ531 auf das IL-1 induzierte Transkriptom analysiert. Vulkanplots sollten den Einfluss der beiden Inhibitoren auf die Genexpression nach 3 h IL-1 Stimulation darstellen (Abb. 4.17 A). Aufgetragen wurde jeweils der $\log_2$ FC gegen $-\log_{10}$ P. Bezogen wurde sich hierbei immer auf die jeweilige Zelllinie, welche mit DMSO behandelt wurde und ebenfalls für 3 h mit IL-1 stimuliert wurde. Diese Darstellung der Daten erlaubte eine gute Übersicht über die Einflüsse der beiden CDK Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass Flavopiridol tiefgreifend und global den NF- κ B Signalweg supprimierte. In den iFTSECs+Leervektor wurden 1429 Gene mehr als vierfach durch die Flavopiridol-Behandlung herunterreguliert. Auch in den iFTSECs+mutKRAS/Myc konnte eine vierfache Unterdrückung der Expression von 1450 Genen gezeigt werden. Dies verdeutlichte den starken Effekt von Flavopiridol auf die IL-1 induzierte Genexpression. Im Gegensatz wies THZ531 einen differentiellen Effekt auf das IL-1 vermittelte Transkriptom auf. In Leervektor-Zellen wurden ebenfalls 995 Gene durch die Inhibition von CDK12/13 im Vergleich zu Zellen, welche mit DMSO behandelt und ebenfalls für 3 h stimuliert wurden, herunterreguliert. Im Gegensatz zu Flavopiridol zeigte THZ531 neben der Suppression vieler Gene aber auch eine Induktion der IL-1 vermittelten Genexpression. In Leervektor-Zellen wurden 1026 Gene nach erfolgter CDK12/13 Inhibition verstärkt exprimiert. Auch für die iFTSECs+mutKRAS/Myc deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass 1110 Transkripte durch die Inhibition von CDK12/13 hochreguliert wurden, während die mRNA Mengen von 683 Transkripten reduziert waren. Der Einfluss von THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression war somit genspezifisch. Die *heatmap* einiger ausgewählter Gene in Abb. 4.17 B verdeutlichte die bereits erwähnten Effekte. Gezeigt wurden hier beispielhaft die $\log_2$ FC verschiedener Gene. Alle selektierten Gene wiesen nach der Behandlung der Zellen mit Flavopiridol einen negativen $\log_2$ FC auf. Die Gene wurden somit herunterreguliert. Bereits nach 1 h IL-1 Stimulation wurde der supprimierende Effekt von Flavopiridol deutlich. *CXCL2* wurde beispielhaft in den mutKRAS/Myc Zellen nach 1 h IL-1 Stimulation mit einem $\log_2$ FC von -9.24 im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle herunterreguliert. Hierbei handelte es sich somit um eine 605-fache Herunterregulation der Expression. Die Inhibition von CDK12/13 hatte nur einen geringen Effekt auf die Genexpression nach 1 h IL-1 Stimulation. Erst nach 3 h IL-1 Stimulation wurde die differentielle Auswirkung des Inhibitors deutlich. *CXCL2*, *JUNB*, *TNF* und *EGR1* wurden als Gene identifiziert, welche durch die Inhibition von CDK12/13 stark hochreguliert wurden. In den Leervektor Zellen lag der $\log_2$ FC von *EGR1* nach 1 h IL-1 Stimulation zum Beispiel bei 6.43. Es handelte sich somit um eine 86-fache Induktion der Expression. Bei dem *Early growth response protein 1 (EGR1)* handelt es sich um ein Gen, welches für einen Transkriptionsfaktor codiert. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Transkriptionsfaktor um einen Tumorsuppressor handelt. Er induziert die Expression von Proteinen, welche für den Wachstumsarrest und die Stressantwort wichtig sind (Wang et

al., 2021). Weitere Gene (Abb. 4.17 B) zeigten hingegen einen negativen $\log_2$ FC und somit eine Herunterregulation der Genexpression. Transkripte, deren Expression durch die Inhibition von CDK12/13 unterdrückt wurde, waren beispielsweise *IL6*, *NLRP3*, *VCAM1*, *ICAM1*, *BIRC3* und *TRAF1*. Die Expression des Haushaltsgens *GAPDH* blieb unterdessen weitestgehend unverändert.

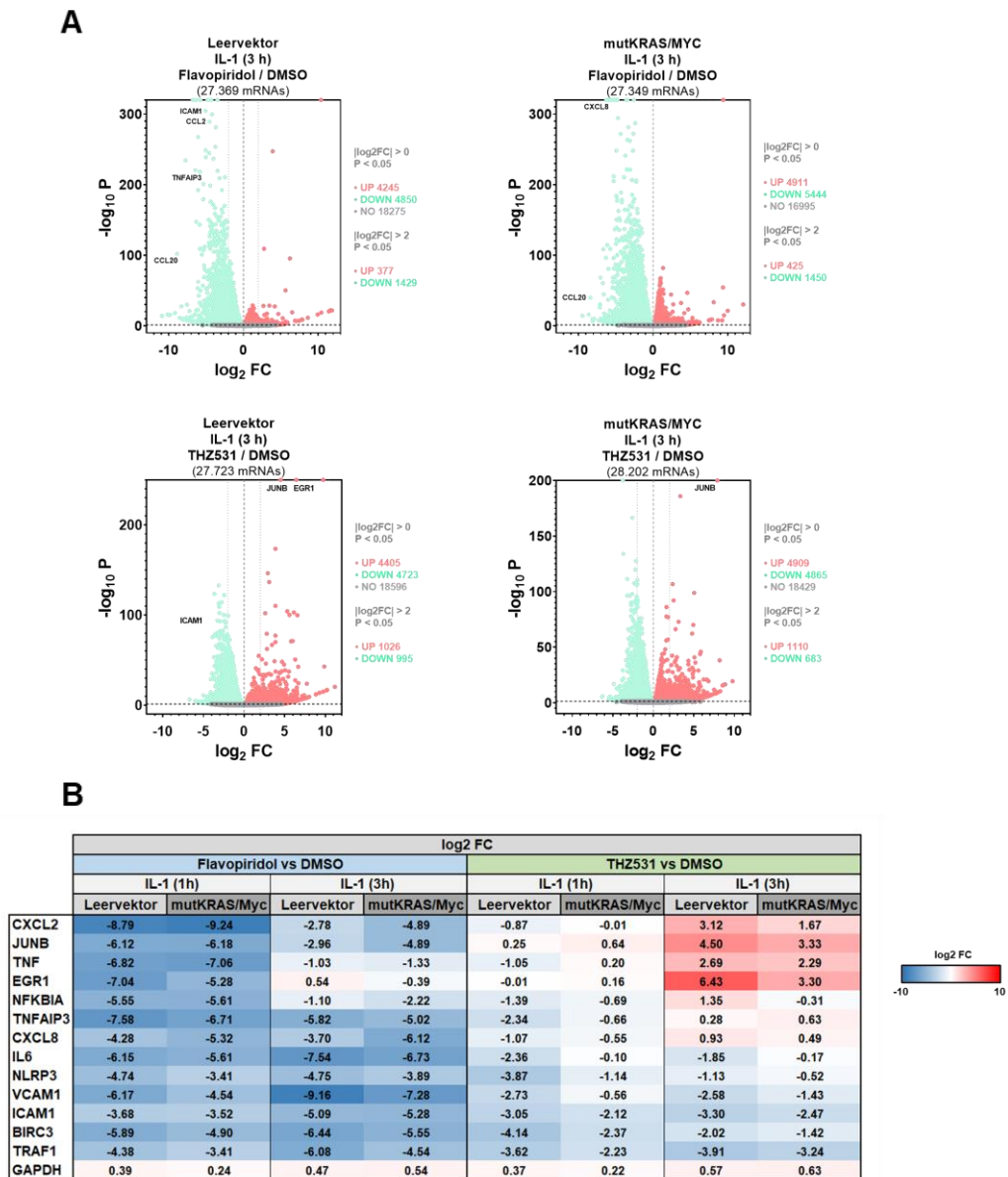


Abb. 4.17 Differenzieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die transkriptomweite, IL-1 induzierte Genexpression in transformierten iFTSECs.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNAseq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über die DESeq2 Analyse. (A) Vulkanplot zum Einfluss von Flavopiridol und THZ531. Aufgetragen wurde der $\log_2$ FC gegen $-\log_{10}$ P. Der Vergleich wurde dabei jeweils zu der Probe der jeweiligen Zelllinie gezogen, welche mit DMSO behandelt und für 3 h mit IL-1 stimuliert wurde. Herunterregulierte Gene sind in Grün und hochregulierte Gene in Rot dargestellt. (B) *Heatmap* einiger selektierter Gene. Gezeigt ist der $\log_2$ FC im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle, welche ebenfalls für die angegebenen Zeitpunkte mit IL-1 stimuliert wurde. Blau deutet auf eine Herunterregulation hin, während Rot auf eine Hochregulation schließen lässt.

Um die Wirkungen der beiden Inhibitoren zu vergleichen, wurden weitere Analysen mit Hilfe von Venn Diagrammen durchgeführt (Abb. 4.18). Es wurden jeweils Transkripte in die Analyse einbezogen, welche folgende Kriterien erfüllten: $\log_2 FC \geq 2$ oder $\log_2 FC \leq -2$ und $P \leq 0.05$. Der Bezug wurde dabei immer zu der Probe der jeweiligen Zelllinie hergestellt, welche mit DMSO behandelt und mit IL-1 stimuliert wurde. Die Analyse zeigte, dass in den Leervektor-Zellen 587 Gene sowohl durch Flavopiridol als auch durch THZ531 mindestens vierfach herunterreguliert wurden. Zu diesen Genen zählten beispielsweise *ICAM1*, *VCAM1*, *TICAM1*, *CSF1*, und *TRAF1*. 408 Gene wurden lediglich durch THZ531 herunterreguliert, während die Expression von 842 Genen ausschließlich durch Flavopiridol unterdrückt wurde. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden hingegen 318 Gene identifiziert, welche durch die Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren mindestens vierfach herunterreguliert wurden. Auch hier wurden *ICAM1* und *TRAF1* als Teil dieser Gene erfasst. 365 Gene wurden in den Krebszellen ausschließlich durch die selektive CDK12/13 Inhibition unterdrückt. Im Gegensatz wurden 1132 Gene lediglich durch die Flavopiridol-Behandlung herunterreguliert. Die Ergebnisse zeigten, dass der supprimierende Effekt von Flavopiridol auf die IL-1 induzierte Genexpression stärker war als der von THZ531. Da die Inhibition von CDK12/13 zu einer Hochregulation einiger Gene führte (Abb. 4.17), wurden außerdem Gene miteinander verglichen, welche nach 3 h IL-1 Stimulation durch Flavopiridol herunterreguliert, jedoch durch THZ531 hochreguliert wurden. Die Venn Diagramme offenbarten, dass in iFTSECs+Leervektor 41 Transkripte durch Flavopiridol supprimiert und durch THZ531 induziert wurden. Zu diesen Genen gehörten auch *CXCL1*, *CXCL2* und *JUNB*. Eine Metascape-Analyse dieser 41 Gene zeigte, dass dabei die Prozesse *TNF signaling* (ko04668) und *response to lipopolysaccharides* (GO:0032496) angereichert wurden (Abb. 8.2). Auch in den mutKRAS/Myc-Zellen wurde *JUNB* als eines von 28 Genen identifiziert, welche nach 3 h IL-1 Stimulation durch Flavopiridol herunterreguliert und durch THZ531 hochreguliert wurden. Insgesamt verdeutlichten diese Daten den starken Effekt von Flavopiridol im Vergleich zu einem selektiven CDK12/13 Inhibitor, welcher differentielle und selektivere Effekte aufwies.

Des Weiteren wurde ein Vergleich zwischen den beiden Zelllinien gezogen (Abb. 4.19). Es wurden Gene einbezogen, welche die genannten Kriterien erfüllten ($\log_2 FC \leq -2$ oder $\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$). Der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol bewirkte eine mindestens vierfache Herunterregulation von 902 Genen in beiden Zelllinien. In den Leervektor-Zellen wurden 527 weitere Gene herunterreguliert. Außerdem wurden 548 Gene identifiziert, welche lediglich in den iFTSECs+mutKRAS/Myc supprimiert wurden. Der Effekt von Flavopiridol auf das globale Genexpressionsprofil der beiden Zelllinien war somit vergleichbar. Der selektive CDK12/13 Inhibitor THZ531 verursachte hingegen eine Herunterregulation von 365 Genen in beiden Zelllinien. In den Leervektor-Zellen wurden 630 zusätzliche Gene herunterreguliert. In den transformierten Zellen wurden lediglich 318 weitere Gene identifiziert. Dies weist darauf

hin, dass THZ531 einen stärkeren suppressierenden Effekt auf die Genexpression der nicht-transformierten Zellen im Vergleich zu iFTSECs+mutKRAS/Myc hatte. Im Gegensatz wurden 550 Gene in beiden Zelllinien durch THZ531 hochreguliert. In den Leervektor-Zellen wurden zusätzlich 476 und in den mutKRAS/Myc-Zellen 560 Gene mindestens vierfach induziert.

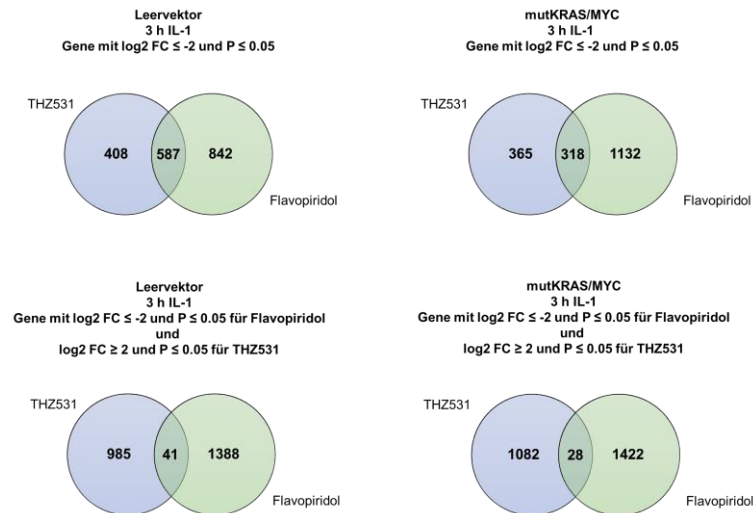


Abb. 4.18 Vergleich der unterschiedlichen Wirkungen von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in transformierten iFTSECs.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über die DESeq2 Analyse. Venn-Diagramme, welche die Wirkungen der beiden Inhibitoren vergleichen, sind dargestellt. In die Analyse einbezogen wurden Transkripte, welche innerhalb folgender Filterung bei einem Vergleich mit der DMSO behandelten und IL-1 stimulierten Probe lagen: $\log_2 FC \geq 2$ oder $\log_2 FC \leq -2$ und $P \leq 0.05$.

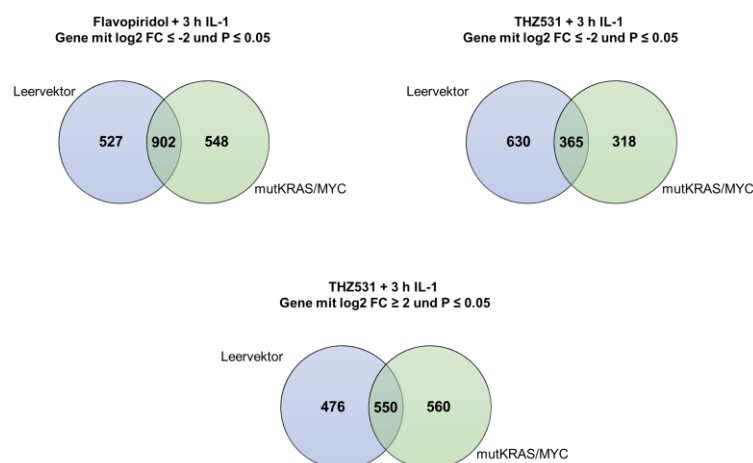


Abb. 4.19 Wirkung von Flavopiridol und THZ531 auf iFTSECs+Leervektor im Vergleich zu iFTSECs+mutKRAS/Myc.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über die DESeq2 Analyse. Venn-Diagramme, welche die Wirkung der beiden Inhibitoren auf die verschiedenen Zelllinien vergleichen, sind dargestellt. In die Analyse einbezogen wurden Transkripte, welche innerhalb folgender Filterung, bei einem Vergleich mit der DMSO behandelten und IL-1 stimulierten Probe der jeweiligen Zelllinie, lagen: $\log_2 FC \geq 2$ oder $\log_2 FC \leq -2$ und $P \leq 0.05$.

Um die Transkripte, auf welche die beiden CDK Inhibitoren einen Einfluss ausübten, genauer zu charakterisieren, wurde eine umfangreiche Anreicherungsanalyse über die Metascape Software (Zhou et al., 2019) durchgeführt. Hierbei wurden die Gene biologischen Prozessen zugeordnet. Für die Analyse wurden alle Transkripte einbezogen, welche eine signifikante und mindestens vierfache Herunterregulation ($\log_2 FC \leq -2$ und $P \leq 0.05$) durch einen der beiden Inhibitoren nach 3 h IL-1 Stimulation aufwiesen. Bezogen wurde sich dabei auf die jeweiligen Zellen, welche als Kontrolle mit DMSO behandelt und für 3 h mit IL-1 stimuliert wurden. Die *heatmap* der TOP 100 angereicherten Prozesse (Abb. 4.20) stellte den negativen Logarithmus des P-Werts dar. Dies ermöglichte eine Interpretation der Signifikanz der Anreicherung der jeweiligen Kategorien. Die Ergebnisse der Metascape-Analyse ließen sich in drei unterschiedliche Kategorien bzw. Cluster gliedern. Eine Kategorie (Cluster III) bestand aus Prozessen, welche sowohl durch die Flavopiridol-Behandlung der Zellen als auch durch die selektive Inhibition von CDK12/13 in beiden Zelllinien angereichert wurden. In dieser Kategorie tauchten biologische Prozesse auf, wie beispielsweise *TNF signaling pathway* (hsa04668), *cytokine signaling in immune system* (R-HSA-1280215), *interleukin-10 signaling* (R-HSA-6783783) und *cytokine-cytokine receptor interaction* (ko04060). Hierbei handelte es sich um Prozesse, welche durch die IL-1 Stimulation ebenfalls signifikant angereicht wurden (Abb. 4.16). Dies deutete darauf hin, dass beide Inhibitoren einen unterdrückenden Effekt auf typische inflammatorische und IL-1 induzierte Signalwege hatten. Allerdings befanden sich nur 11 der TOP 100 angereicherten Prozesse in diesem Cluster. Das größte Cluster bildete Cluster II. Hierin enthalten waren 48 Prozesse, welche lediglich durch Flavopiridol in beiden Zelllinien angereichert wurden. Die Inhibition der Elongations-assoziierten CDKs führte in keiner der beiden Zelllinien zu einer Anreicherung dieser Prozesse. In dieser Kategorie waren Prozesse enthalten, die beispielsweise eine Rolle beim Wachstum bzw. der Proliferation oder der Differenzierung der Zellen spielen. Aber auch die Prozesse *receptor signaling pathway via JAK-STAT* (GO:0007259) und *regulation of response to cytokine stimulus* (GO:0060759) wurden ausschließlich durch Flavopiridol angereichert. Insgesamt verdeutlichte diese Kategorie den immensen Effekt von Flavopiridol im Vergleich zu THZ531. Das dritte und auch interessanteste Cluster bildete Cluster I. In diesem Cluster waren 41 Prozesse enthalten, welche ebenfalls durch Flavopiridol in beiden Zelllinien angereichert wurden. In den Leervektor-Zellen wurden diese Prozesse auch durch THZ531 angereichert. Lediglich in den iFTSECs+mutKRAS/Myc war keine Anreicherung dieser Prozesse nach der THZ531-Behandlung zu beobachten. Dies ließ darauf schließen, dass Gene dieser Prozesse durch die Inhibition von CDK12/13 in nicht-transformierten Zellen unterdrückt wurden, in transformierten Krebszellen hingegen nicht. Beispielsweise wurden inflammatorische Prozesse wie *regulation of cytokine production* (GO:0001817), *lipopolysaccharide-mediated signaling pathway* (GO:0031663) und *positive regulation of interleukin-6 production* (GO:0032755) gefunden.

Hierzu gehörten Gene wie *IL6*, *IL1A*, *IL1B*, *TRAF6*, *TNFAIP3* und *CCL2*. Weitere Prozesse, welche eine Rolle bei der Entzündungsreaktion spielen, waren *leukocyte differentiation* (GO:0002521), *AP1 Pathway* (M167) und auch *regulation of cell adhesion* (GO:0030155) inklusive der Gene *ICAM1* und *VCAM1*. Des Weiteren waren die Prozesse *positive regulation of cell death* (GO:0010942) und *apoptotic signaling pathway* (GO:0097190) angereichert. Diese spielen eine Rolle beim Zelltod. Gene dieser Gruppen wurden somit durch THZ531 in den Leervektor-Zellen mindestens vierfach herunterreguliert in den iFTSECs+mutKRAS/Myc jedoch nicht. Die *heatmap* der selektierten Gene in Abb. 4.17 deutete bereits auf diesen Effekt hin. Der $\log_2$ FC von *EGR1* lag beispielsweise in mutKRAS/Myc-Zellen nach 3 h IL-1 Stimulation bei 3.30 verglichen zu 6.43 in den Leervektor-Zellen. Der *fold change* (FC) der dargestellten Gene war in den transformierten Zellen stets niedriger verglichen mit den Leervektor-Zellen.

Insgesamt zeigten die Auswertungen der RNA Sequenzierung, dass Flavopiridol einen starken Effekt auf das Genexpressionsprofil der Zellen hatte. Diese Effekte waren dabei unabhängig vom genetischen Status der Zellen. Die Inhibition von CDK12/13 durch den selektiven Inhibitor THZ531 zeigte wiederum differentielle Effekte auf die IL-1 induzierte Genexpression. Der Einfluss von THZ531 war genspezifisch. Auch konnten Unterschiede zwischen den nicht-transformierten Zellen und den iFTSECs+mutKRAS/Myc gezeigt werden. Die Krebszellen schienen die Inhibition kompensieren zu können. Der Effekt von THZ531 auf das Transkriptom war somit abhängig vom Mutationsstatus der Zellen.

A

GO	Beschreibung	-log ₁₀ (P)			
		3 h IL-1			
		Flavopiridol vs DMSO		THZ531 vs DMSO	
		Leervektor	KRAS/Myc	Leervektor	KRAS/Myc
WP1449	Regulation of toll-like receptor signaling pathway	9.17	7.71	3.49	
WP5087	Malignant pleural mesothelioma	8.95	6.57	3.58	
GO:0001503	ossification	7.15	7.58	3.10	
GO:0007389	pattern specification process	6.43	6.39	3.48	
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	9.30	6.78	3.65	
GO:0002221	pattern recognition receptor signaling pathway	8.10	6.20	3.80	
GO:0002831	regulation of response to biotic stimulus	7.21	6.20	3.15	
GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	6.66	7.54	3.12	
MS4	PID IL12 2PATHWAY	8.29	4.07	3.03	
GO:0001656	metanephros development	8.80	7.11	5.02	
WP4462	Platelet-mediated interactions with vascular and circulating cells	8.85	7.21	4.32	
GO:0072677	eosinophil migration	8.49	7.20	5.97	
GO:0048645	animal organ formation	6.23	7.07	5.30	
WP2849	Hematopoietic stem cell differentiation	12.19	6.38	3.75	
GO:0031347	regulation of defense response	14.77	8.93	3.85	
GO:0032755	positive regulation of interleukin-6 production	11.64	6.55	5.41	
GO:0045639	positive regulation of myeloid cell differentiation	6.60	8.90	2.89	
R-HSA-9614085	FOXO-mediated transcription	6.23	7.07	2.91	
GO:0043549	regulation of kinase activity	7.56	6.43	2.21	
WP4149	White fat cell differentiation	6.73	8.98	2.88	
GO:0048705	skeletal system morphogenesis	5.65	7.88	2.83	
GO:0042481	regulation of odontogenesis	6.12	4.84	2.16	
WP2877	Vitamin D receptor pathway	7.61	5.79	2.11	
WP4341	Non-genomic actions of 1,25 dihydroxyvitamin D3	6.58	4.25	2.05	
GO:0002274	myeloid leukocyte activation	7.11	4.46	2.31	
hsa05166	HTLV-I infection	6.50	5.95	2.24	
hsa04010	MAPK signaling pathway	7.44	5.93	2.47	
GO:0016055	Wnt signaling pathway	6.63	5.35	2.01	
GO:0051090	regulation of DNA-binding transcription factor activity	13.98		3.80	
GO:0009792	embryo development ending in birth or egg hatching	13.50	14.98	3.43	
M167	PID AP1 PATHWAY	14.44	14.40	3.43	
GO:0030155	regulation of cell adhesion	21.13	13.67	3.69	
GO:0010942	positive regulation of cell death	15.55	16.57	2.95	
GO:0008285	negative regulation of cell population proliferation	16.87	14.77	2.05	
GO:0007190	apoptotic signaling pathway	12.08	11.52	2.42	
GO:0045596	negative regulation of cell differentiation	12.89	16.38	2.06	
GO:0080135	regulation of cellular response to stress	10.19	12.94	2.78	
GO:0048598	embryonic morphogenesis	11.79	13.24	2.93	
GO:0002521	leukocyte differentiation	19.14	17.85	8.21	
GO:0001817	regulation of cytokine production	16.22	11.00	5.14	
GO:0072111	cell proliferation involved in kidney development	5.03	2.97	3.73	
M115	PID REG GR PATHWAY	6.56	5.77		
GO:0007219	Notch signaling pathway	7.01	5.78		
GO:0009896	positive regulation of catabolic process	6.30	5.86		
ko05133	Pertussis	7.01	4.67		
GO:0048972	homeostasis of number of cells	6.97	5.42		
GO:0007259	cytokine signaling pathway via JAK-STAT	7.06	3.67		
GO:0070848	response to growth factor	10.86	5.38		
GO:0060759	regulation of response to cytokine stimulus	7.50	7.48		
GO:0040008	regulation of growth	6.93	8.06		
GO:0002683	negative regulation of immune system process	7.37	8.26		
GO:0033002	muscle cell proliferation	7.91	8.46		
GO:0061061	muscle structure development	9.08	7.78		
GO:0071496	cellular response to external stimulus	9.04	8.46		
GO:1902532	negative regulation of intracellular signal transduction	9.53	9.01		
GO:0050678	regulation of epithelial cell proliferation	9.21	8.15		
GO:0048589	developmental growth	6.91	8.47		
M145	PID PS3 DOWNSTREAM PATHWAY	9.69	6.79		
GO:0051384	response to glucocorticoid	6.25	6.24		
M166	PID ATF2 PATHWAY	6.75	8.59		
WP3888	VEGFA-VEGFR2 signaling pathway	7.23	6.75		
R-HSA-112409	RAF-independent MAPK1/3 activation	7.21	8.47		
R-HSA-373076	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	6.47	8.45		
WP236	Adipogenesis	7.14	7.12		
GO:0030855	epithelial cell differentiation	6.55	6.88		
GO:0030183	B cell differentiation	5.34	7.25		
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	4.55	7.66		
GO:0048511	rhythmic process	5.17	6.57		
GO:0043433	negative regulation of DNA-binding transcription factor activity	4.76	7.01		
GO:0014009	glial cell proliferation	4.85	6.59		
WP69	T-cell receptor (TCR) signaling pathway	5.95	6.68		
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle	5.06	6.64		
GO:0035270	endocrine system development	4.74	7.35		
GO:1901652	response to peptide	5.58	8.02		
GO:0097193	intrinsic apoptotic signaling pathway	5.48	8.00		
WP2857	Mesodermal commitment pathway	5.85	7.08		
GO:0060021	roof of mouth development	4.87	6.33		
GO:0014013	regulation of gliogenesis	5.26	8.97		
WP2880	Glucocorticoid receptor pathway	9.23	10.16		
GO:0048608	reproductive structure development	8.10	10.58		
GO:0045444	fat cell differentiation	8.08	11.90		
GO:0007507	heart development	9.46	11.27		
WP5094	Orexin receptor pathway	10.76	12.28		
GO:0001568	blood vessel development	17.86	14.71		
GO:0048729	tissue morphogenesis	10.63	11.04		
GO:0071396	cellular response to lipid	17.15	18.83		
GO:0007423	sensory organ development	3.70	5.34		
WP366	TGF-beta signaling pathway	5.09	5.69		
GO:0035019	hematic stem cell population maintenance	3.11	6.60		
hsa04668	TNF signaling pathway	22.05	23.08	5.16	4.10
R-HSA-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	23.18	18.48	9.96	4.62
ko04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	23.82	12.45	6.36	2.95
R-HSA-6783783	Interleukin-10 signaling	16.18	14.87	2.19	3.10
WP254	Apoptosis	7.06	8.69	2.22	3.41
WP3617	Photodynamic therapy-induced NF-kB survival signaling	15.05	36.45	3.66	2.69
R-HSA-877300	Interferon gamma signaling	10.92	5.93	6.33	4.91
GO:0009615	response to virus	11.65	9.37	5.53	4.13
R-HSA-5669034	TNFs bind their physiological receptors	7.33	3.24	6.38	4.12
GO:0042088	T-helper 1 type immune response	6.51	3.03	3.16	2.36
GO:0048525	negative regulation of viral process	9.93	5.16	5.46	2.51

B

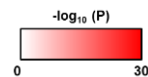
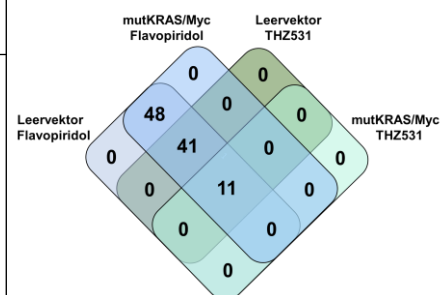


Abb. 4.20 Anreicherungsanalyse mittels Metascape zum Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression in iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. (A) Metascapeanalysen von Transkripten, welche durch Flavopiridol oder THZ531 nach 3 h IL-1 Stimulation in iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu DMSO behandelten und stimulierten Zellen herunterreguliert wurden, wurden durchgeführt. Die Transkripte mussten folgende Kriterien erfüllen: $\log_2 FC \leq -2$ und $P \leq 0.05$. In der *heatmap* wurden $-\log_{10} P$ Werte der Überrepräsentationsanalyse dargestellt. Gezeigt sind die TOP100 angereicherten *pathways*. (B) Venn-Analyse der jeweils angereicherten *pathways* unter den einzelnen Bedingungen.

4.1.4 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Proteinsekretion in Ovarialkarzinomzellen

Die zelluläre und molekulare Zusammensetzung des Tumormikromilieus spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression des Eierstockkrebses. Das extrazelluläre, molekulare Tumormikromilieu besteht zum Teil aus Chemokinen, inflammatorischen Zytokinen, Integrinen und anderen sekretierten Molekülen (Yang et al., 2020) und wird daher stark durch NF- κ B beeinflusst (Capece et al., 2017). Aus diesem Grund war es interessant den Einfluss der CDK Inhibitoren Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Proteinsekretion in Ovarialkarzinomzellen spezifisch und global zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden OVCAR-4 Zellen für 1 h mit Flavopiridol oder THZ531 vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Kontrolle mit DMSO behandelt oder gänzlich unbehandelt gelassen. Anschließend wurden einige Zellen zusätzlich für 16 h mit IL-1 α stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden schließlich für Sekretomanalysen geerntet. Des Weiteren wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden als Kontrolle der Inhibitorbehandlung zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. Zudem wurden die mittels Bradford-Messung bestimmten Proteinkonzentrationen verwendet, um die Sekretomanalyse auf die Gesamtzellzahl zu normalisieren. Die absoluten Proteinkonzentrationen von IL-8, CXCL2, CCL20 und ICAM1 wurden in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse dieser Sekretomanalyse (Abb. 4.21) ließen darauf schließen, dass der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol einen supprimierenden Effekt auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion hatte. Die Sekretion aller getesteten Proteine wurde durch die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol vollständig unterdrückt. Die selektive Inhibition von CDK12/13 durch den kovalenten Inhibitor THZ531 hatte ebenfalls eine Unterdrückung der IL-1 induzierten Freisetzung von ICAM1 zur Folge. Im Gegensatz wurde die Sekretion von CXCL2 und CCL20 vermehrt induziert, wenn die Zellen mit THZ531 vorbehandelt wurden. Die basale Sekretion von IL-8 war in den Ovarialkarzinomzellen sehr hoch. Durch die Behandlung der Zellen mit THZ531 bei simultaner IL-1 Stimulation wurde die IL-8 Konzentration leicht (nicht signifikant) erhöht. Dies bestätigte den differentiellen Effekt von THZ531, welcher bereits in den Genexpressionsanalysen beobachtet wurde. Die Western Blot Analyse (Abb. 4.22) zeigte zudem, dass in den OVCAR-4 Zellen die Behandlung der Zellen mit THZ531 für 17 h keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von Pol II hatte. Wurden die Zellen hingegen mit Flavopiridol behandelt, war die Proteinmenge von Pol II leicht reduziert. Die Phosphorylierung von (S2)-Poll II wurde hingegen durch die Anwendung beider Inhibitoren stark vermindert. Des Weiteren hatte die Flavopiridol-Behandlung eine starke Reduzierung der Rb-Phosphorylierung zur Folge. Wurden CDK12/13 selektiv inhibiert, nahm die Phosphorylierung von Rb ebenfalls in einem geringen Ausmaß ab. Hierbei handelte es sich allerdings nicht um einen signifikanten Effekt. Auf die Gesamtproteinmenge von p65 hatten beide Inhibitoren keinen Einfluss. Die IL-1

induzierte Phosphorylierung von p65 wurde hingegen durch die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol oder THZ531 für 17 h stark reduziert. Bereits die basale Phosphorylierung von p65 war signifikant vermindert. Wurden die OVCAR-4 Zellen für 17 h mit Flavopiridol behandelt, konnte I κ B α im Western Blot nicht detektiert werden. Die Gesamtproteinmenge von I κ B α war auch ohne erfolgte IL-1 Stimulation vollständig depletiert. Die Inhibition von CDK12/13 hatte in diesem Fall keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von I κ B α . Die IL-1 induzierte Synthese von A20 wurde durch Flavopiridol unterdrückt. THZ531 sorgte hingegen für ein verstärktes Auftreten von A20 nach 17 h Inhibitorbehandlung und 16 h IL-1 Stimulation. Die Detektion von β -Actin und Actinin diente des Nachweises der gleichmäßigen Gelbeladung. Die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 4.22 B) erfolgte anhand der Intensitäten der Chemilumineszenz.

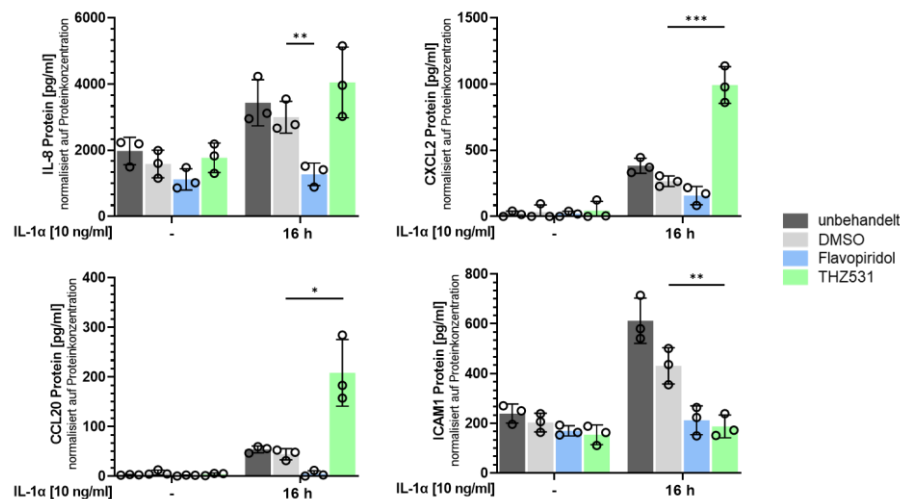


Abb. 4.21 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in OVCAR-4 Zellen. OVCAR-4 Zellen wurden mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen zusätzlich für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und in ELISA-Analysen für IL-8, CXCL2, CCL20 und ICAM1 eingesetzt. Dargestellt sind die anhand den erstellten Standardreihen berechneten Proteinkonzentrationen. Die Werte wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

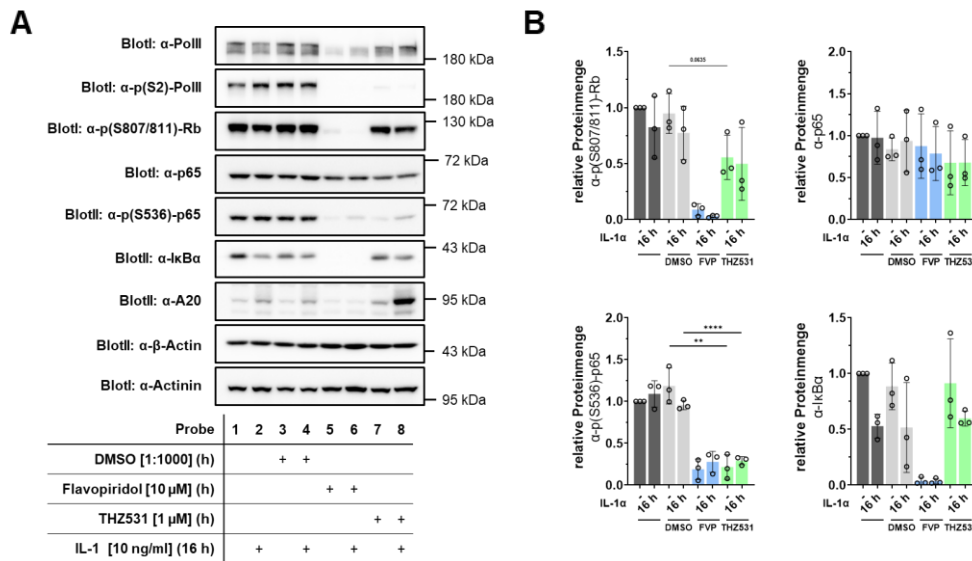


Abb. 4.22 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in OVCAR-4 Zellen.

OVCAR-4 Zellen wurden mit Flavopiridol (FVP) [10 μM] oder THZ531 [1 μM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und eine Zellyse wurde durchgeführt. (A) Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg in OVCAR-4 Zellen. Die Proteinmenge wurde auf die unbehandelte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Zusätzlich sollte der Einfluss der CDK Inhibition auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in transformierten iFTSECs untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss der Transformation auf die Sekretion der Zytokine analysiert werden. Hierfür wurden iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und die zu Krebszellen transformierten iFTSECs+mutKRAS/Myc mit Flavopiridol oder THZ531 behandelt. Einige Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO behandelt, während weitere Zellen unbehandelt blieben. Nach einer einstündigen Vorbehandlung wurden die Zellen zusätzlich für 16 h mit IL-1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände und die Zellen geerntet. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate für Proteindetektionen im Western Blot verwendet. Die Proteinkonzentrationen, welche über die Bradford-Messung bestimmt wurden, wurden verwendet, um Sekretomanalysen zu normieren. Um eine Aussage über die Proteinsekretion treffen zu können, wurden Sandwich-ELISAs für IL-8, CXCL2, CCL20, IL-6 und ICAM1 mit den geernteten Zellkulturüberständen durchgeführt. Dabei wurden die absoluten Proteinkonzentrationen anhand einer geeigneten Standardreihe ermittelt.

Die Ergebnisse der Sekretomanalyse (Abb. 4.23) zeigten, dass die lentivirale Transduktion der iFTSECs mit einem Leervektor keinen Einfluss auf die basale Sekretion bzw. die IL-1 induzierte Sekretion der Proteine hatte. Wurden die Zellen allerdings transformiert, indem Myc überexprimiert und eine *gain-of-function* Mutante von KRAS exprimiert wurde, konnten

Veränderungen auf die Sekretion beobachtet werden. Die basale Sekretion von IL-8 wurde durch die Transformation der Zellen reduziert. In iFTSECs und iFTSECs+Leervektor wurden basal ca. 2000 pg/ml IL-8 sekretiert. In iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden hingegen lediglich ca. 300 pg/ml im Zellkulturüberstand gemessen, wenn die Zellen nicht stimuliert wurden. Auch die basale Menge von ICAM1 im Zellkulturüberstand war in den transformierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp und Leervektor Zellen reduziert. Die basalen Sekretionen von CXCL2, CCL20 und IL-6 wurden hingegen durch die Transformation nicht beeinflusst. Wurden die Zellen mit IL-1 stimuliert, konnten ebenfalls Unterschiede in den Proteinkonzentrationen der sekretierten Proteine zwischen den Zelllinien festgestellt werden. Die IL-1 induzierte Sekretion von CCL20, IL-6 und ICAM1 war in iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu iFTSECs und iFTSECs+Leervektor reduziert. Im Gegensatz war die IL-1 vermittelte Sekretion von CXCL2 in den transformierten Krebszellen erhöht. Die Inhibition verschiedener CDKs durch den pan-CDK Inhibitor Flavopiridol hatte in allen Zelllinien eine Supprimierung der IL-1 induzierten Proteinsekretion von IL-8, CXCL2, CCL20, IL-6 und ICAM1 zur Folge. Wurden die Zellen mit Flavopiridol behandelt, war die gemessene Proteinkonzentration nach erfolgter IL-1 Stimulation vergleichbar mit der Proteinkonzentration der unstimulierten Zellen. Die IL-1 Stimulation der Zellen führte somit zu keiner Induktion der Sekretion in Flavopiridol behandelten Zellen. Wurden die Zellen mit dem selektiven CDK12/13 Inhibitor THZ531 behandelt, traten unterschiedliche Effekte auf. Die IL-1 induzierte Sekretion von IL-8 nahm in den iFTSECs und den transformierten iFTSECs+mutKRAS/Myc zu. In den iFTSECs+Leervektor nahm die Sekretion von IL-8 ebenfalls zu. Allerdings handelte es sich hierbei nicht um eine signifikante Zunahme. Die IL-1 vermittelte Sekretion von CXCL2 und CCL20 nahm hingegen lediglich in den iFTSECs+mutKRAS/Myc signifikant zu. Die verstärkte Sekretion von CXCL2 und CCL20 durch THZ531 war somit ein Merkmal für die transformierten Krebszellen. In iFTSECs und iFTSECs+Leervektor nahm die IL-1 induzierte Sekretion von IL-6 signifikant ab. Auch in iFTSECs+mutKRAS/Myc war die IL-6 Sekretion nach erfolgter CDK12/13 Inhibition reduziert. Da die IL-1 induzierte Sekretion von IL-6 in unbehandelten bzw. in DMSO behandelten iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu iFTSECs und iFTSECs+Leervektor bereits reduziert war, fiel die Reduktion der IL-6 Sekretion durch THZ531 in den transformierten Krebszellen allerdings schwächer aus. Die IL-1 induzierte Freisetzung von ICAM1 wurde in allen drei Zelllinien durch die CDK12/13 Inhibition verringert.

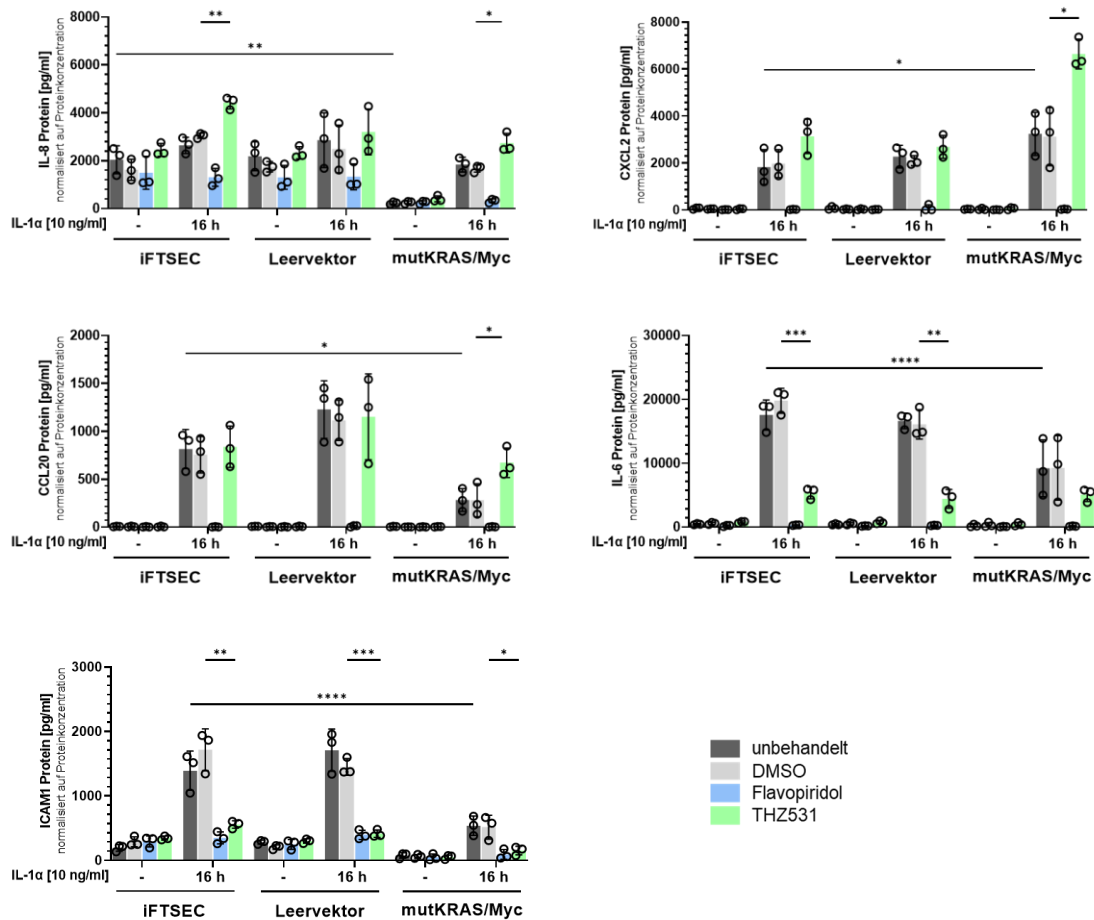


Abb. 4.23 Differenzielle Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in transformierten iFTSECs.

iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen zusätzlich für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und im ELISA für IL-8, CXCL2, CCL20, IL-6 und ICAM1 eingesetzt. Dargestellt sind die anhand den erstellten Standardreihen berechneten Proteinkonzentrationen. Die Werte wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Die Signifikanzanalyse wurde mittels Two-way ANOVA durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Zur Überprüfung der CDK Inhibition wurden parallel zur Sekretomanalyse Western Blot Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse (Abb. 4.24) zeigten, dass die Phosphorylierung von (S2)-Pol II und (S5)-Pol II in allen drei Zelllinien durch die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol reduziert wurde. Auch die Inhibition von CDK12/13 führte zu einer Reduzierung der Phosphorylierungen von (S2)-Pol II und (S5)-Pol II in allen drei Zelllinien. Diese Reduzierung fiel in den iFTSECs+mutKRAS/Myc allerdings im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen stärker aus. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass die Phosphorylierung von Rb in iFTSECs+mutKRAS/Myc verstärkt auftrat. Jan Dreute (AG Schmitz) zeigte in seiner Arbeit, dass diese Zellen sich außerdem schneller teilten (Dreute, 2023). Wurden die Zellen mit Flavopiridol behandelt nahm die Phosphorylierung von Rb in allen Zelllinien stark ab bzw. war nicht mehr detektierbar. Lediglich in den iFTSECs+mutKRAS/Myc nahm die Phosphorylierung von Rb auch durch die Behandlung der

Zellen mit THZ531 ab. Des Weiteren zeigte die Western Blot Analyse, dass die Gesamtproteinmenge von p65 durch beide Inhibitoren verringert wurde. Allerdings fiel dieser Effekt in den iFTSECs+mutKRAS/Myc wesentlich stärker aus. Auch die IL-1 induzierte Phosphorylierung von p65 wurde durch beide Inhibitoren im Vergleich zu unbehandelten bzw. DMSO behandelten Zellen verringert. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde die p65-Phosphorylierung dabei im Vergleich zu iFTSECs und iFTSECs+Leervektor stärker beeinflusst. Flavopiridol suppressierte die Synthese von I κ B α vollständig. Sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach der IL-1 Stimulation wurde I κ B α nicht im Western Blot detektiert. Die Inhibition von CDK12/13 sorgte in iFTSECs und iFTSECs+Leervektor für eine verringerte Gesamtproteinmenge von I κ B α . Die Re-Synthese von I κ B α wurde durch THZ531 unterdrückt. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc hatte THZ531 hingegen keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von I κ B α . Dieser Effekt trat lediglich bei den nicht-transformierten Zellen auf. Die Detektion der Proteine β -Actin und Actinin diente dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung. Die Quantifizierung der Western Blots erfolgte anhand der Chemilumineszenz-Intensitäten (Abb. 4.24 B).

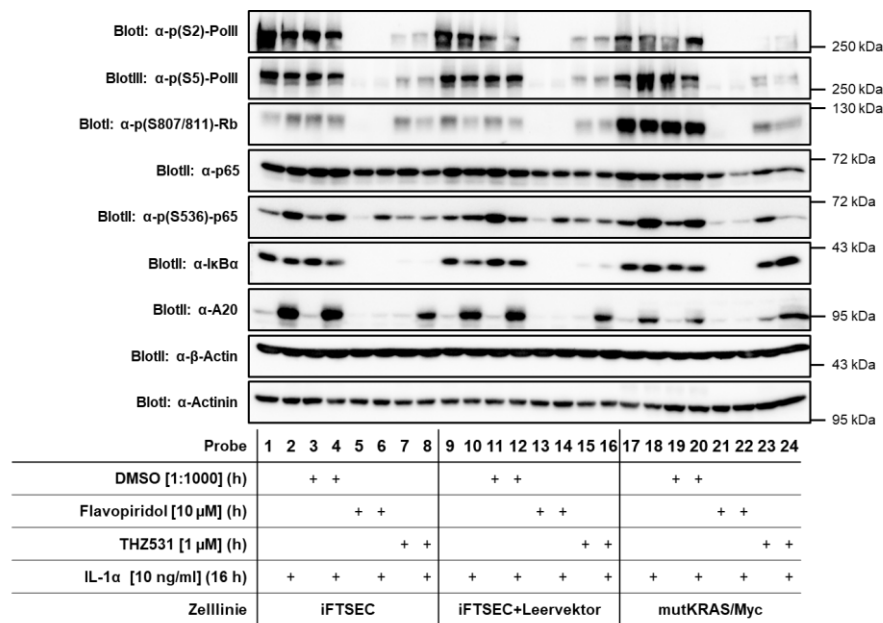
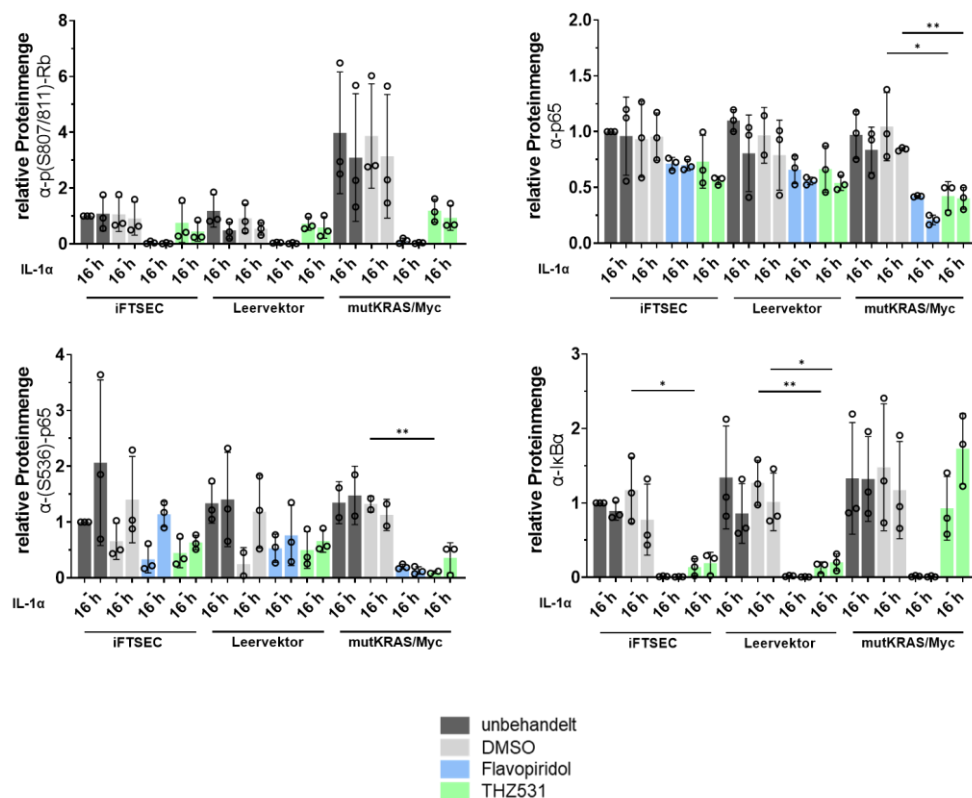
A**B**

Abb. 4.24 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in transformierten iFTSECs.

iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc Zellen wurden mit Flavopiridol (FVP) [10 μM] oder THZ531 [1 μM] vorbehandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt oder wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und eine Zelllyse wurde durchgeführt. (A) Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss der CDK Inhibitoren auf den IL-1 Signalweg. Die Proteinmenge wurde auf die unbehandelten iFTSECs normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Zusätzlich zu den Sekretomanalysen selektierter Proteine mittels ELISA, war es wichtig, eine unvoreingenommene, globale Analyse des Sekretoms in die Charakterisierung des Phänotyps der iFTSECs mit einzubeziehen. Zu diesem Zweck wurde das Sekretom mittels Olink Technologie untersucht. Dafür wurden Zellkulturüberstände der iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc, welche für 1 h mit DMSO, Flavopiridol oder THZ531 vorbehandelt und anschließend zusätzlich für 16 h mit IL-1 stimuliert wurden, in das Labor von Prof. Johannes Graumann (Philipps-Universität Marburg) übergeben. Dort wurde eine sogenannte Olink Analyse durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Proteinmengen erfolgte über einen sogenannten *proximity extension assay* (PEA), welcher über eine Next-Generation Sequenzierung (NGS) ausgewertet wurde (siehe 3.3.7). Nach erfolgter Normalisierung der Daten lieferte die Analyse sogenannte *normalized protein expression* (NPX)-Werte. Dieser $\log_2$ -transformierte Wert gibt Auskunft über die individuellen Proteinmengen. Die Werte wurden dabei sowohl auf eine interne Kontrolle (Extension Control) als auch auf die externe Kontrolle (Plate Control) normalisiert. Ein hoher NPX-Wert lässt somit auf eine hohe relative Proteinkonzentration des jeweiligen Proteins schließen. Dabei ist zu beachten, dass die NPX-Werte lediglich innerhalb desselben Proteins zwischen den verschiedenen Proben verglichen werden können, aber nicht zwischen verschiedenen Projekten und Proteinen. Es wird daher jeweils eine relative Quantifizierung verwendet, um Unterschiede zwischen individuellen Proteinmengen zwischen den verschiedenen Proben zu identifizieren (Assarsson et al., 2014; Wik et al., 2021).

Um den Einfluss der Transformation der Zellen und der IL-1 Stimulation zu analysieren, wurden Vulkanplots erstellt. Aufgetragen wurde dafür jeweils der $\log_2$ FC gegen $-\log_{10} P$ (Abb. 4.25). Der $\log_2$ FC wurde durch Subtraktion der jeweiligen NPX-Werte, welche bereits $\log_2$ skaliert waren, berechnet. Näher betrachtet wurden Proteine, welche mindestens vierfach und signifikant dereguliert waren ($\log_2$ FC ≥ 2 oder $\log_2$ FC ≤ -2 und $P \leq 0.05$). Die Ergebnisse zeigten, dass die Transformation der Zellen bereits einen Einfluss auf das basale Sekretom der Zellen hatte (Abb. 4.25 A). In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden im Vergleich zu iFTSECs+Leervektor 78 Proteine verstärkt sekretiert. Des Weiteren wurde die Sekretion von 48 Proteinen mindestens vierfach ($\log_2$ FC ≤ -2) herunterreguliert. Die IL-1 Stimulation sorgte hingegen für eine verstärkte Sekretion von 43 Proteinen in den iFTSECs+Leervektor (Abb. 4.25 B) und 33 Proteinen (Abb. 4.25 C) in den iFTSECs+mutKRAS/Myc. Eine Venn-Analyse (Abb. 4.25 D) der mindestens vierfach und signifikant induzierten Proteine zeigte, dass 26 Proteine sowohl in iFTSECs+mutKRAS/Myc als auch in iFTSEC+Leervektor nach erfolgter IL-1 Stimulation verstärkt sekretiert wurden. Zu diesen Proteinen gehörten beispielsweise CCL17, CCL8, CXCL6, CXCL3, CCL20, TNF und VCAM1 (Abb. 4.25 E). Lediglich 5 Proteine wurden ausschließlich in iFTSECs+mutKRAS/Myc hochreguliert. Im Gegensatz wurden

14 Proteine ausschließlich in iFTSECs+Leervektor verstärkt durch die IL-1 Stimulation sekretiert.

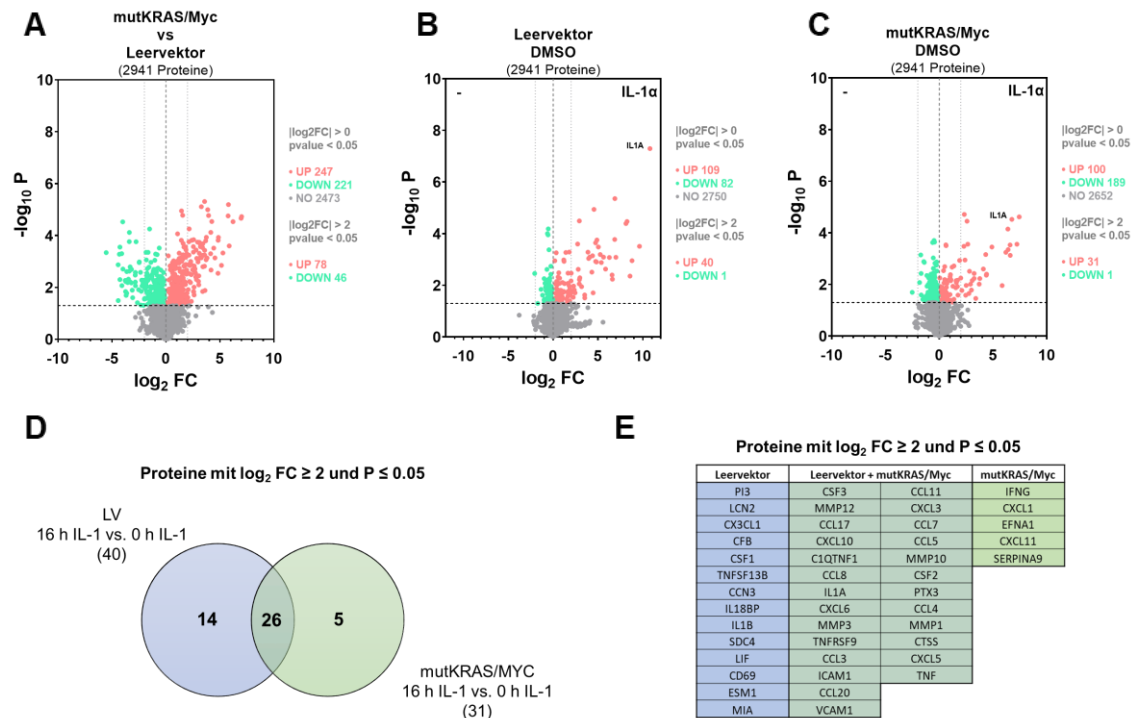


Abb. 4.25 Die Transformation der iFTSECs beeinflusst die basale und IL-1 induzierte Proteinsekretion.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände wurde geerntet und über PEA (Olink) analysiert. (A-C) Vulkanplots zum Einfluss der Transformation auf die iFTSECs und die IL-1 induzierte Proteinsekretion. Bezogen wurde sich dabei auf die unstimulierte Probe der jeweiligen Zelllinie. Aufgetragen wurde der $\log_2 FC$ gegen $\log_{10} P$. Herunterregulierte Proteine sind in Grün und hochregulierte Proteine in Rot dargestellt. (D) Venn Diagramm zum Einfluss der Transformation der iFTSECs auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion. In die Analyse einbezogen wurden Proteine, welche innerhalb folgender Filterung bei einem Vergleich mit der unstimulierten Probe lagen: $\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$. (E) Auflistung der IL-1 induzierten Proteine ($\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$).

Des Weiteren wurden die Auswirkungen von Flavopiridol und THZ531 auf das Sekretom der Zellen mittels Vulkanplots analysiert (Abb. 4.26). Aufgetragen wurde jeweils der $\log_2 FC$ gegen $\log_{10} P$. Ein Bezug wurde jeweils zu den DMSO behandelten Zellen, welche ebenfalls mit IL-1 stimuliert wurden, hergestellt. Die Analyse zeigte, dass Flavopiridol einen starken Einfluss auf das Sekretom der Zellen hatte. In iFTSECs+Leervektor wurden 290 Proteine mindestens vierfach hochreguliert während 64 Proteine vermindert sekretiert wurden, darunter z.B. VCAM1, IL-6 und TNF. In iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden 312 Proteine verstärkt freigesetzt. Die Sekretion von 48 Proteinen war wiederum mindestens vierfach verringert. Flavopiridol hatte somit einen differentiellen Effekt auf Zusammensetzung der Zellkulturüberstände (Abb. 4.26).

Entgegen der Genexpressionsanalysen und den ELISA Experimenten wurden viele Proteine nach erfolgter Flavopiridol-Behandlung verstärkt von den Zellen abgegeben. Eine Gegenüberstellung der relativen Änderungen im ELISA und der NPX-Werte demonstrierte die Vergleichbarkeit der beiden Methoden (Abb. 8.3). Eine ausführliche Anreicherungsanalyse

mittels Metascape (Abb. 4.27) zeigte, dass die hochregulierten Proteine überwiegend klassischen intrazellulären Prozessen zugeordnet werden konnten, wie beispielsweise *amino acid metabolic process* (GO:0006520), *nucleotide metabolic process* (GO:0009117), *positive regulation of cell cycle* (GO:0045787), *apoptotic signaling pathway* (GO:0097190), *regulation of apoptotic signaling pathway* (GO:2001233) und *regulation of cellular catabolic process* (GO:0031329). Einige dieser Prozesse wurden dabei lediglich in iFTSECs+mutKRAS/Myc angereichert.

Venn-Analysen, welche zum Vergleich der RNASeq und der Olink Analyse dienten, zeigten (Abb. 8.5), dass kein Protein, welches durch Flavopiridol verstärkt freigesetzt wurde, auch verstärkt auf mRNA Ebene exprimiert wurde. Weitere Analysen zeigten außerdem, dass bereits die basale Freisetzung vieler Proteine durch Flavopiridol induziert wurde. Vulkanplots zeigten, dass in iFTSECs+Leervektor 135 Proteine durch die Flavopiridol-Behandlung der Zellen vermehrt freigesetzt wurden. In iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden ebenfalls 69 Proteine verstärkt im Zellkulturüberstand detektiert, wenn die Zellen ausschließlich mit Flavopiridol behandelt wurden (Abb. 8.4). All dies ließ die Vermutung zu, dass diese Proteine von apoptotischen Zellen freigesetzt wurden.

Proteine, deren IL-1 induzierte Sekretion durch Flavopiridol supprimiert wurde, konnten hingegen Prozessen wie *complement system* (WP2806), *response to wounding* (GO:0009611), *cytokines and inflammatory response* (WP530) und *overview of proinflammatory and profibrotic mediators* (WP5095) zugeordnet werden (Abb. 4.27). Flavopiridol hatte somit einen supprimierenden Effekt auf die Sekretion von Proteinen, welche an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Ein Vergleich mit den Genexpressionsanalysen zeigte, dass in den iFTSECs+Leervektor 35 dieser Proteine bereits auf mRNA Ebene dereguliert waren. In iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden ebenfalls 29 Gene sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene supprimiert (Abb. 8.5).

Der selektive CDK12/13 Inhibitor THZ531 hatte unter den gegebenen Filterkriterien im Vergleich zu Flavopiridol nur einen geringen Effekt auf das IL-1 vermittelte Sekretom der Zellen. In iFTSECs+Leervektor wurden ausschließlich 7 Proteine erhöht im Zellkulturüberstand gemessen, wenn die Zellen mit THZ531 behandelt und mit IL-1 stimuliert wurden. Unter diesen Proteinen befand sich beispielsweise TNF. Die IL-1 induzierte Sekretion von lediglich 23 Proteinen war im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen, welche ebenfalls mit IL-1 stimuliert wurden, verringert. Acht dieser Proteine wurden bereits in den Genexpressionsanalysen als suppressierte Gene identifiziert (Abb. 8.6). Auch in iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden 15 Proteine mindestens vierfach durch THZ531 im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen herunterreguliert. Die mRNA Expression von fünf dieser Proteine war ebenfalls reduziert. Ausschließlich 3 Proteine wurden durch THZ531 in

iFTSECs+mutKRAS/Myc verstärkt sekretiert. TNF war dabei das einzige Protein, welches bereits auf mRNA Ebene verstärkt exprimiert wurde. THZ531 zeigte somit einen überwiegend supprimierenden Effekt auf das IL-1 induzierte Sekretom. Eine ausführliche Metascape-Analyse (Abb. 4.27) der mindestens vierfach herunterregulierte Proteine zeigte, dass in beiden Zelllinien Prozesse wie *overview of proinflammatory and profibrotic mediators* (WP5095) und *regulation of cell-cell adhesion* (GO:0022407) angereichert wurden. Die Sekretion der Proteine, die diesen Prozessen angehören, wurde somit nach erfolgter IL-1 Stimulation durch die THZ531-Behandlung vermindert. Zudem zeigte die Analyse, dass Prozesse wie beispielsweise *positive regulation of protein phosphorylation* (GO:0001934), *complement system* (WP2806) und *regulation of apoptotic signaling pathway* (GO:2001233) lediglich in den iFTSECs+Leervektor angereichert wurden. Die Effekte fielen somit in iFTSECs+mutKRAS/Myc schwächer aus. Diese Beobachtung glich somit den Ergebnissen der RNASeq. Unter basalen Bedingungen zeigte THZ531 keinen Effekt auf das Sekretom der Zellen. In iFTSECs+Leervektor wurden lediglich 3 Proteine mindestens vierfach und signifikant hochreguliert und 1 Protein herunterreguliert (Abb. 8.4). Die Anreicherungsanalyse zeigte, dass 36 Prozesse lediglich durch Flavopiridol angereicht wurden, während kein Prozess ausschließlich durch THZ531 angereichert war (Abb. 4.27 B). Der Effekt von THZ531 auf das Sekretom war somit im Vergleich zu Flavopiridol deutlich selektiver.

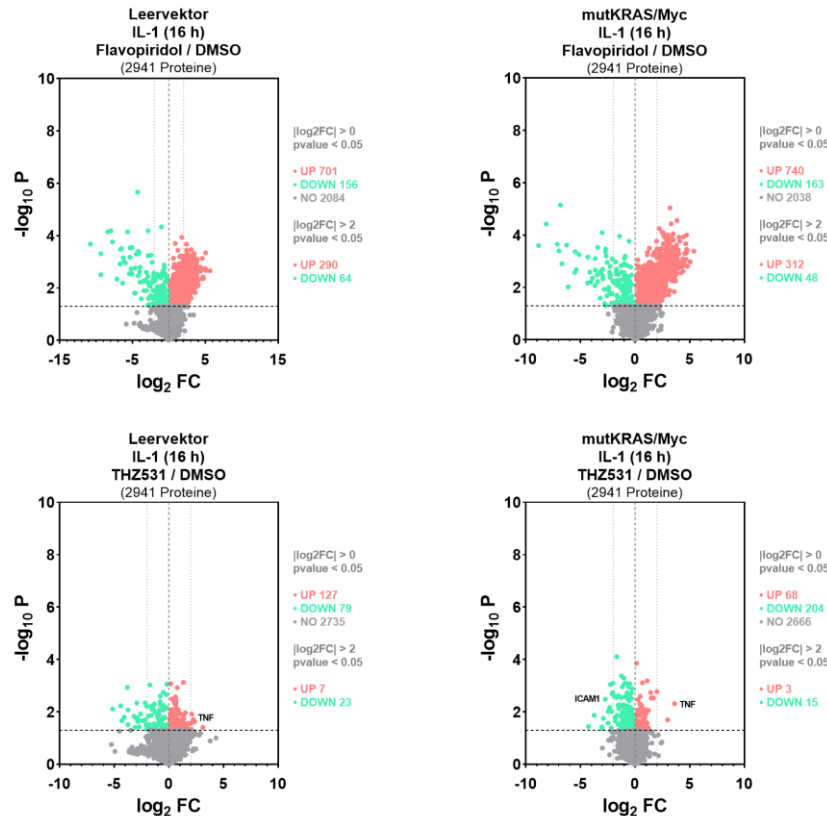
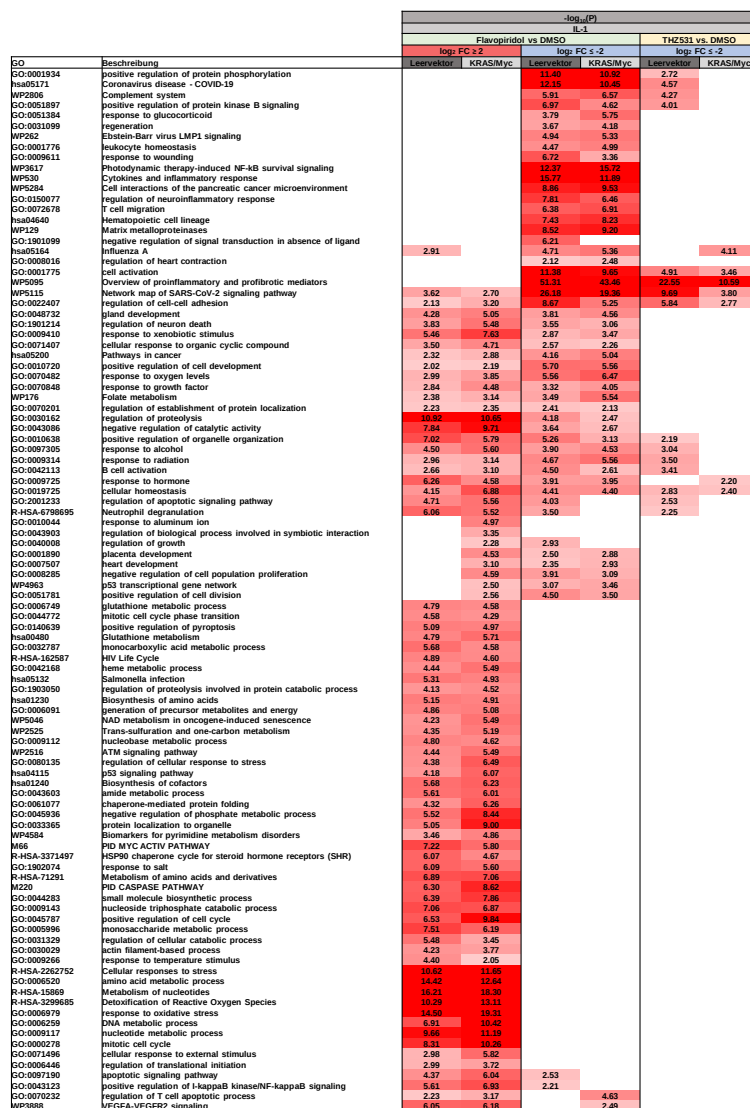


Abb. 4.26 Flavopiridol und THZ531 beeinflussen die IL-1 induzierte Proteinsekretion in transformierten iFTSECs differentiell.

Ergebnisse

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen zusätzlich für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. (A) Vulkanplot zum Einfluss von Flavopiridol und THZ531. Aufgetragen wurde der $\log_2$ FC gegen $-\log_{10} P$. Der Vergleich wurde dabei jeweils zu der Probe der jeweiligen Zelllinie gezogen, welche mit DMSO behandelt und für 16 h mit IL-1 stimuliert wurde. Herunterregulierte Proteine sind in Grün und hochregulierte Proteine in Rot dargestellt.

A



B

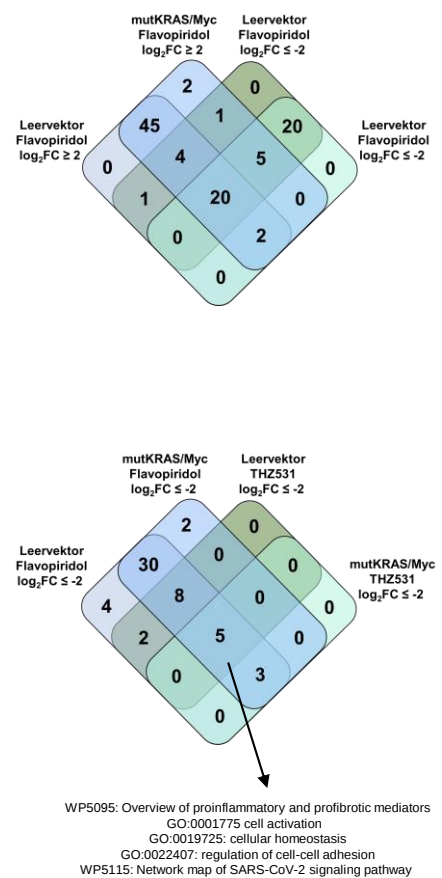


Abb. 4.27 Anreicherungsanalyse mittels Metascape zum Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Proteinsekretion von iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. (A) Metascapeanalysen von Proteinen, welche durch Flavopiridol oder THZ531 nach 16 h IL-1 Stimulation in iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu DMSO behandelten und stimulierten Zellen hochreguliert bzw. herunterreguliert wurden. Die Proteine mussten folgende Kriterien erfüllen: $\log_2 FC \leq -2$ oder $\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$. In der heatmap wurden $-\log_{10} P$ Werte der Überrepräsentationsanalyse dargestellt. Gezeigt sind die TOP100 angereicherten pathways. (B) Vergleichende Venn-Analysen der jeweils angereicherten Prozesse unter den verschiedenen Bedingungen.

Der Einfluss der Inhibitoren auf Proteine, welche von Ovarialkarzinomzellen nach erfolgter Stimulation der Zellen mit IL-1 verstärkt sekretiert werden, wurde im Folgenden genauer analysiert. Die TOP 20 der IL-1 regulierten Proteine, welche von iFTSECs+Leervektor nach 16 h IL-1 Stimulation verstärkt sekretiert wurden, wurden näher betrachtet. Hierzu wurde aus den NPX-Werten die relative Proteinsekretion berechnet. Die Berechnung erfolgte wie folgt:

$$\text{Relative Proteinsekretion} = 2^{(\text{NPX (Probe)} - \text{NPX (Leervektor + DMSO)})}$$

Die Ergebnisse (Abb. 4.28) zeigten, dass vor allem Zytokine durch die IL-1 Stimulation sekretiert wurden. Unter den TOP 20 IL-1 regulierten Proteinen befanden sich beispielsweise CCL4, CCL17, CCL8, CXCL3, CCL20 und CCL3. Auch die kolonie-stimulierenden Faktoren CSF2 und CSF3 gehörten zu den TOP 20 der freigesetzten Proteine. Des Weiteren wurden die Matrix-Metalloproteasen MMP1, MMP3 und MMP10 als IL-1 regulierte Proteine identifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass einige Proteine von iFTSECs+Leervektor im Vergleich zu iFTSECs+mutKRAS/Myc verstärkt nach erfolgter IL-1 Stimulation sekretiert wurden. CCL4, MMP1, VCAM1 und MMP10 wurden von iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu iFTSECs+Leervektor in einem geringeren Ausmaß sekretiert. CCL17 und CCL8 wurden von den transformierten Krebszellen ebenfalls kaum freigesetzt. Die IL-1 Responsivität der iFTSECs+mutKRAS/Myc in Bezug auf das Sekretom erschien verringert. Auch die IL-1 vermittelte Sekretion von CCL20 war in den transformierten Krebszellen verringert. Dies spiegelte die Ergebnisse der ELISA Experimente wider (Abb. 4.23, Abb. 8.3). Im Gegensatz wurden CXCL3 und CSF3 verstärkt von iFTSECs+mutKRAS/Myc nach erfolgter IL-1 Stimulation in die Zellkulturüberstände abgegeben. Analysen der basalen Proteinmengen zeigten zudem, dass beispielsweise CCL3, CXCL3, MMP3 und CXCL5 vermehrt von unstimulierten iFTSECs+mutKRAS/Myc sekretiert wurden (Abb. 8.7).

Wie bereits die Genexpressionsanalysen und die ELISA Experimente zeigten, suppressierte Flavopiridol die Expression von IL-1 Zielgenen maßgeblich. Auch die IL-1 induzierte Sekretion der TOP20 IL-1 regulierten Proteine wurden durch Flavopiridol vollständig unterbunden. THZ531 hatte hingegen einen differentiellen Effekt auf unterschiedliche Proteine. Die IL-1 induzierte Sekretion von CCL4, MMP12, CCL7, PI3 und MMP3 wurden beispielsweise in beiden Zelllinien durch THZ531 verringert. Hingegen wurde sowohl die basale als auch die IL-1 induzierte Sekretion von CXCL3 und TNF in iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc stark erhöht. Die IL-1 induzierte Sekretion von CCL3 war in iFTSECs+Leervektor reduziert während sie in iFTSECs+mutKRAS/Myc erhöht war. Somit unterstützte diese sekretomweite Analyse die Annahme, dass THZ513 einen differentiellen Effekt auf das IL-1 vermittelte Tumorsekretom ausübt, während Flavopiridol die Entzündungsreaktion und die damit verbundene Entstehung einer inflammatorischen Umgebung unterdrückt.

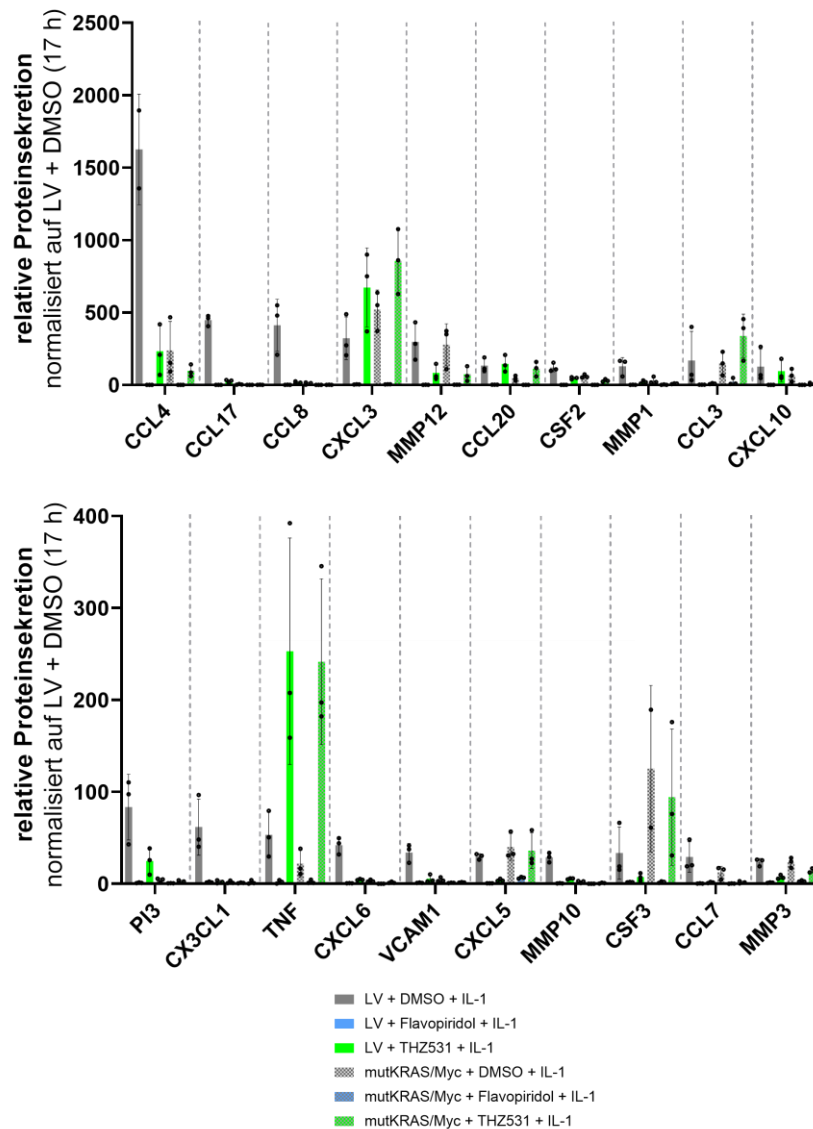


Abb. 4.28 Differentieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Sekretion der TOP 20 IL-1 regulierten Proteine.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. Die relative Proteinsekretion wurde aus den NPX-Werten berechnet. Die Normalisierung erfolgte auf die DMSO behandelten iFTSECs+Leervektor (unstimuliert). Die Auswirkungen der Inhibitoren auf die TOP 20 Proteine, welche in iFTSECs+Leervektor durch IL-1 induziert wurden, sind gezeigt.

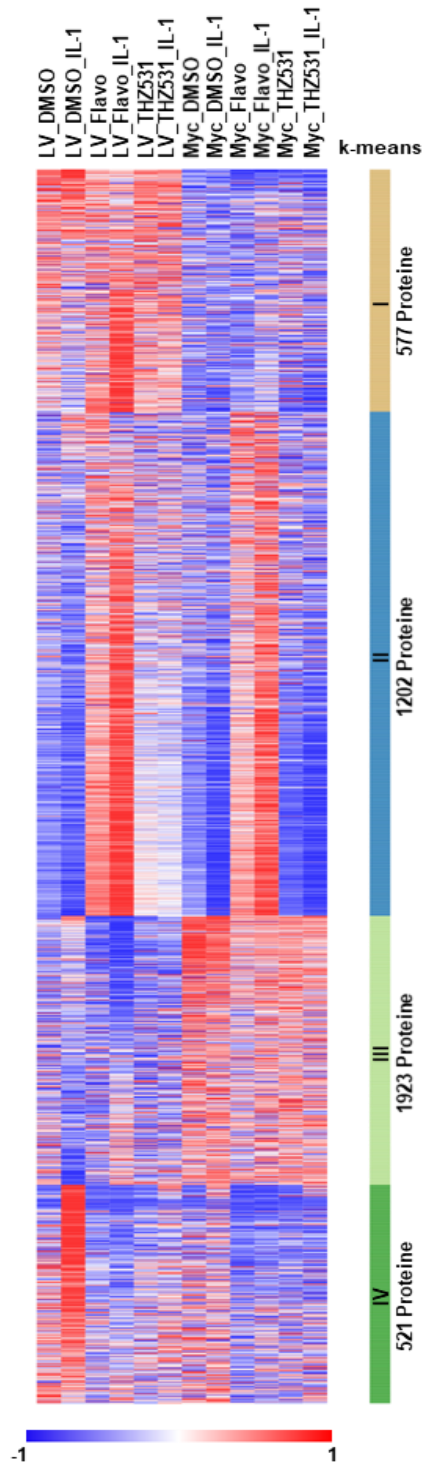
Zusätzlich wurde eine Datenmatrix bzw. *heatmap* für alle gemessen 4223 sezernierten Proteine erstellt. Hierfür wurden die Mittelwerte der NPX-Werte mittels Morpheus-Software dargestellt (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). Mittels der Software wurde eine Z-Skalierung vorgenommen, um die Messwerte in einem einheitlichen Datenintervall abbilden zu können. Außerdem wurden die Daten einem k-means Clustering unterzogen. Das Sekretionsmuster konnte dadurch in vier verschiedene Cluster segregiert werden (Abb. 4.29). Die vier erzeugten Cluster wurden außerdem über die *collapse*-Funktion basierend auf den

Mittelwerten pro Cluster zusammengefasst (Abb. 4.29 B). Zudem wurden die ermittelten Z-scores der einzelnen Proteine der jeweiligen Cluster zur besseren Veranschaulichung in Boxplots dargestellt (Abb. 4.29 C). Die Matrix zeigte, dass in Cluster I Proteine enthalten waren, welche in den iFTSECs+Leervektor im Vergleich zu iFTSECs+mutKRAS/Myc verstärkt sekretiert wurden. Vor allem die simultane Behandlung der iFTSECs+Leervektor mit Flavopiridol und IL-1 sorgte für eine erhöhte Freisetzung dieser Proteine. Eine Anreicherungsanalyse mittels Metascape zeigte, dass in diesem Cluster Prozesse wie *cell-cell adhesion* (GO:0098609), *neutrophil degranulation* (R-HSA-6798695) oder *blood vessel development* (GO:0001568) angereichert wurden (Abb. 4.30). Das zweite Cluster visualisierte Proteine, deren Freisetzung durch Flavopiridol induziert wurde. Diese Proteine waren nicht IL-1 reguliert. Eine simultane Behandlung der Zellen mit Flavopiridol und IL-1 sorgte für eine weitere Zunahme der Sekretion in beiden Zelllinien. In diesem Cluster waren Prozesse wie beispielsweise *response to oxidative stress* (GO:0006979), *metabolism of nucleotides* (R-HSA-15869) oder *cellular response to stress* (R-HSA-2262752) angereichert. Im dritten Cluster befanden sich Proteine, welche von den iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu iFTSECs+Leervektor verstärkt sekretiert wurden. Die Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die Freisetzung dieser Proteine. Unter den angereicherten Prozessen waren die Prozesse *enzyme-linked receptor protein signaling pathway* (GO:0007167) oder *positive regulation of phosphorylation* (GO:0042327) zu finden. Aber auch inflammatorische Prozesse wie *cytokine-cytokine receptor interaction* (hsa04060) oder *inflammatory response* (GO:0006954) wurden in Cluster III angereichert. Cluster IV listete hingegen Proteine, welche in den iFTSECs+Leervektor IL-1 abhängig sekretiert wurden. In den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde die Sekretion dieser Proteine ebenfalls durch IL-1 induziert, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Die IL-1 Responsivität der transformierten Krebszellen schien somit verringert. Die Inhibitoren hatten überwiegend einen supprimierenden Effekt auf die Sekretion der Proteine dieses Clusters. Der unterdrückende Effekt von Flavopiridol fiel dabei verglichen zu THZ531 deutlicher aus. Einige Proteine dieses Clusters wurden durch THZ531 auch verstärkt sekretiert. Die Prozessanalyse mittels Metascape zeigte, dass in diesem Cluster überwiegend inflammatorische Prozesse angereichert wurden, darunter *cytokine-cytokine receptor interaction* (hsa04060), *overview of proinflammatory and profibrotic mediators* (WP5095) und *innate immune response* (GO:0045087). Venn-Diagramme zeigten zudem, dass die einzelnen Prozesse zwischen den verschiedenen Clustern meist einzigartig angereichert wurden (Abb. 4.30 B). Lediglich 8 Prozesse wurden in allen Clustern angereichert z.B. *positive regulation of immune response* (GO:0050778), *positive regulation of cytokine production* (GO:0001819) und *response to wounding* (GO:0009611).

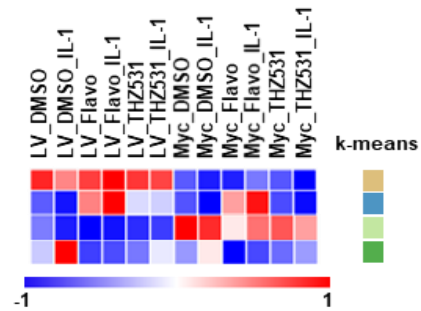
Insgesamt unterstützten die Sekretomdaten die bereits beobachteten Effekte der beiden Inhibitoren. Flavopiridol unterdrückte die IL-1 induzierte Sekretion vieler Proteine. Einige

Proteine wurden allerdings verstärkt durch die Flavopiridol-Behandlung der Zellen in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Allerdings wurde keines dieser Proteine auf mRNA Ebene hochreguliert. THZ531 hatte ebenfalls einen differentiellen Effekt auf das IL-1 induzierte Sekretom.

A



B



C

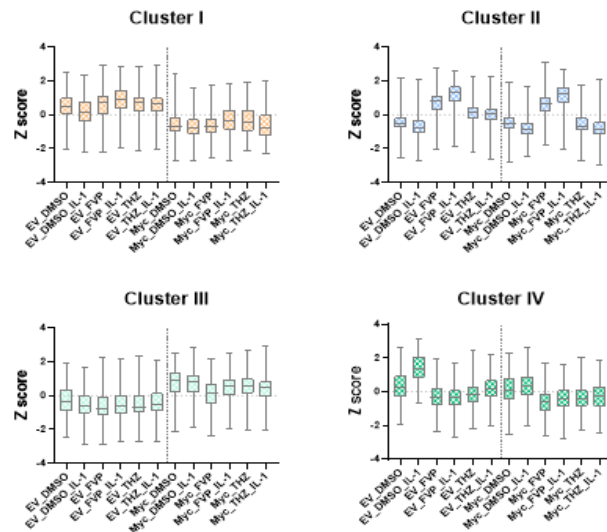


Abb. 4.29 Heatmap Darstellung der Z-skalierten NPX-Mittelwerte zur Untersuchung des Einflusses von Flavopiridol und THZ531 auf das Sekretom.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 µM] oder THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. Die NPX-Mittelwerte aller gemessenen 4223 sezernierten Proteine wurden mittels Morpheus Software des Broad-Institutes visualisiert. (A) Eine Z-Skalierung und ein k-means Clustering wurden durchgeführt. (B) Zudem wurden die Cluster zusammengefasst. Blaue Färbungen deuten auf einen niedrigen NPX-Wert hin während rote Färbungen auf einen hohen NPX-Wert schließen lassen. (C) Die ermittelten Z-Scores der Proteine der jeweiligen Cluster wurden zudem in Boxplots dargestellt.

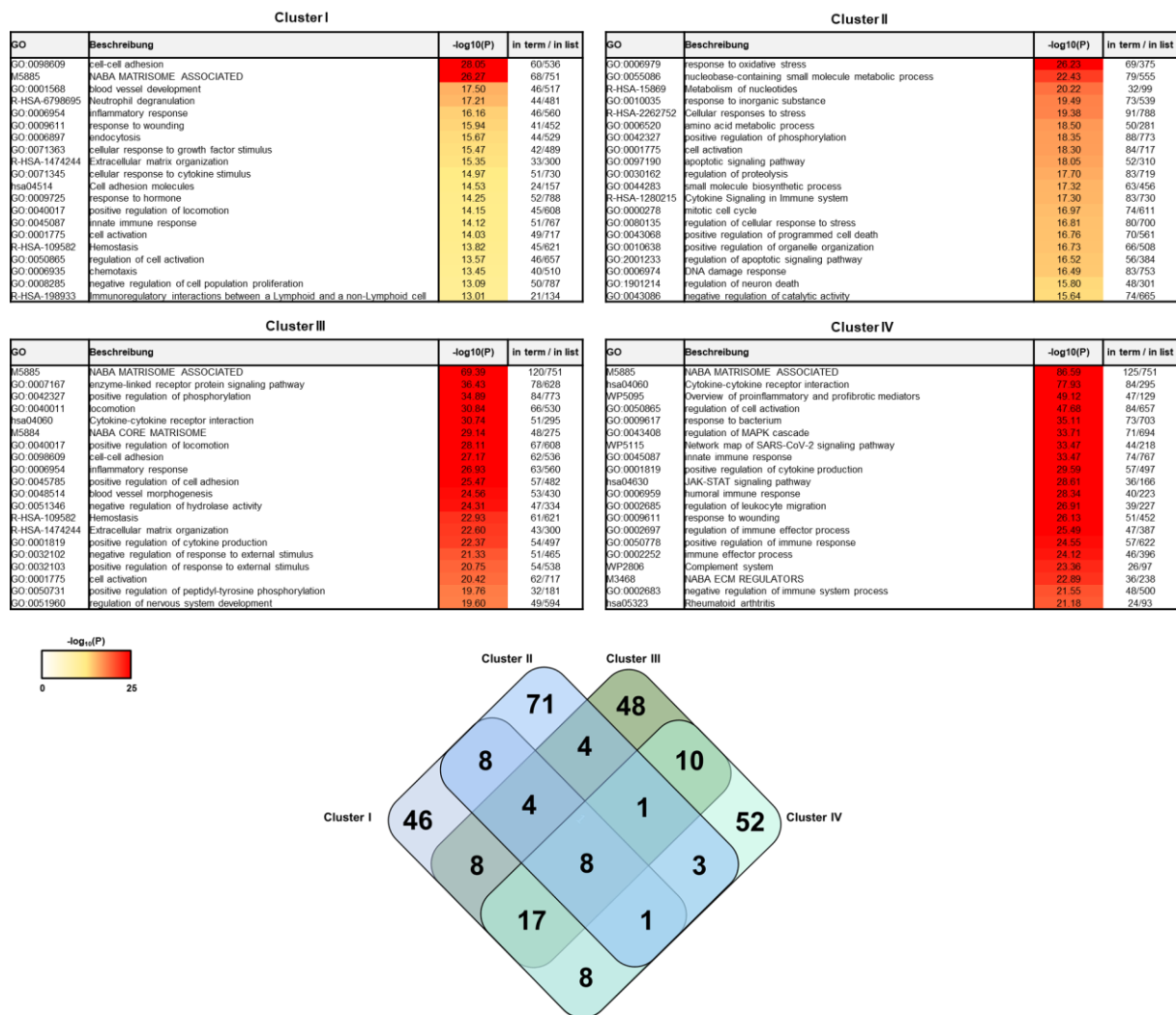


Abb. 4.30 Anreicherungsanalysen der Proteine aus den vier erzeugten Clustern mittels Metascape.

Die NPX-Mittelwerte der Olink Analyse wurden mittels Morpheus Software des Broad-Institutes visualisiert. Eine Z-Skalierung und ein k-means Clustering wurden durchgeführt. Vier Cluster wurden dabei erzeugt. Die Proteine aus den einzelnen Clustern wurden mittels Metascape Software analysiert. Die TOP 20 angereicherten *pathways* wurden als -log₁₀ P Werte der Überrepräsentationsanalyse dargestellt. (B) Vergleichende Venn-Analysen der TOP100 angereicherten *pathways* der jeweiligen Cluster.

Um eine vergleichende Analyse der Effekte auf das Transkriptom und das Sekretom zu ermöglichen, wurde eine Darstellung gewählt, die eine Visualisierung von multiplen Variablen ermöglichte. Hierfür wurde jeweils der $\log_2$ FC der RNA Mengen gegen den $\log_2$ FC der jeweiligen Proteinlevel aufgetragen (Abb. 4.31). Alle Proteine, welche durch Olink gemessen wurden, wurden ebenfalls auf mRNA Ebene analysiert. Die Korrelation der Daten wurde mittels Pearson-Koeffizient (R) angegeben. Zudem wurde das Bestimmtheitsmaß (R^2) ermittelt. Wurden iFTSECs+Leervektor oder iFTSECs+mutKRAS/Myc mit IL-1 stimuliert konnte sowohl auf RNA Ebene als auch auf Proteinebene eine Zunahme einiger Gene/Proteine im Vergleich zu unstimulierten Zellen verdeutlicht werden (Abb. 4.31). Gene/Proteine, welche in iFTSECs+Leervektor auf mRNA Ebene und auf Proteinebene mindestens vierfach hochreguliert ($\log_2\text{FC} \geq 2$) wurden, wurden in allen Graphen farblich markiert, um die Effekte auf die inflammatorischen Gene zu verdeutlichen (Abb. 4.31). Die Auswertung bestätigte erneut die beschriebenen Effekte der beiden CDK Inhibitoren auf die IL-1 induzierte Genexpression und Proteinsynthese. Flavopiridol hatte einen globalen supprimierenden Effekt auf die Genexpression und auf die Proteinsynthese in beiden Zelllinien. Die Darstellung verdeutlichte, dass vor allem die Synthese von inflammatorischen Genen betroffen war, welche in iFTSECs+Leervektor durch IL-1 induziert wurden. Der differentielle und selektivere Effekt von THZ531 wurde durch die Darstellung ebenfalls erneut beschrieben. Einige Gene/Proteine wurden herunterreguliert während andere induziert wurden. Die IL-1 induzierten Gene wurden dabei allerdings überwiegend herunterreguliert. TNF und CXCL3 wurden allerdings sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene hochreguliert. Insgesamt zeigten die Korrelationen eine breite Streuung. Allerdings konnten biologische Schlüsse aus den Daten gezogen werden. Die Inhibitoreffekte wurden erneut bestätigt. Um die Korrelation der Daten auf inflammatorischer Ebene detaillierter zu analysieren, wurden lediglich die 521 Proteine aus Cluster IV der Clusteranalyse mittels Morpheus (Abb. 4.29) in die Auswertung einbezogen. Hierbei handelte es sich um die IL-1 induzierten Proteine. Wurden lediglich diese 521 Proteine betrachtet, konnte eine erhöhte Korrelation der Daten beschrieben werden (Abb. 8.8).

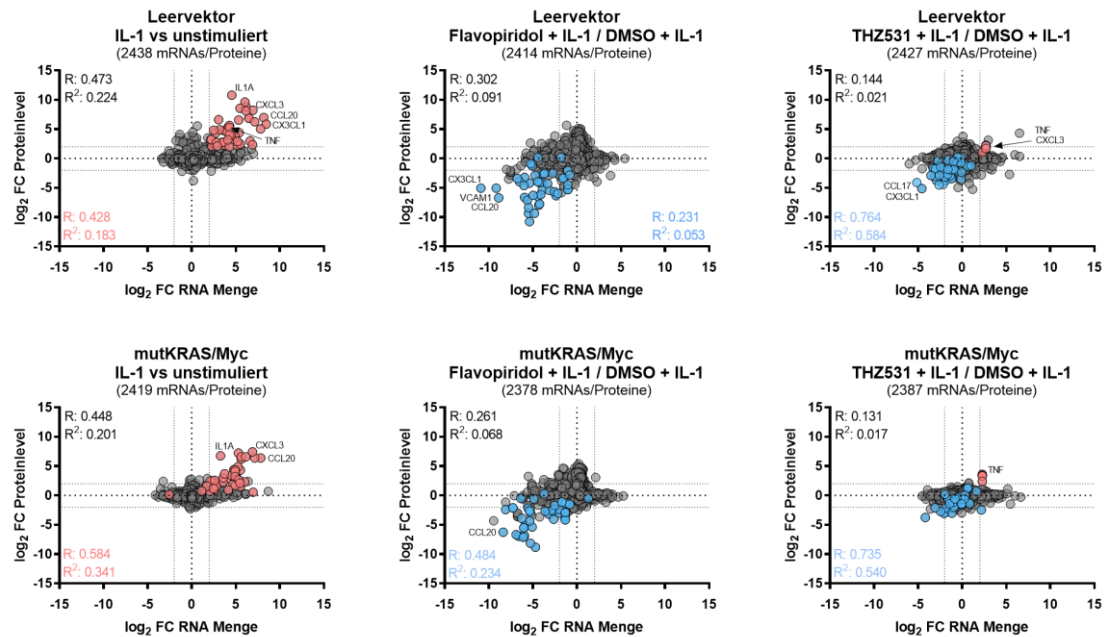


Abb. 4.31 Korrelationsanalyse der globalen Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte mRNA Expression und Proteinsekretion.

Die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion von iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde in den vorangegangenen Darstellungen detailliert analysiert. Um eine vergleichende Analyse der beiden RNASeq Daten und der Olink Daten durchzuführen, wurde jeweils der log₂ FC der RNA-Menge gegen den log₂ FC der Proteinlevel aufgetragen. Alle Gene, welche für Proteine codieren, welche mittels Olink gemessen wurden, wurden in die Analyse einbezogen. Ein Bezug wurde jeweils zu den DMSO behandelten Zellen hergestellt. Gene/Proteine, welche in iFTSECs+Leervektor sowohl in der Transkriptomanalyse als auch in der Sekretomanalyse durch die IL-1 Stimulation mindestens vierfach hochreguliert (log₂ FC ≥ 2) wurden, wurden jeweils farblich hervorgehoben. Der Pearson-Koeffizient R und das Bestimmtheitsmaß R² wurde mittels GraphPad Prism ermittelt.

4.2 Beeinflussung des NF- κ B Signalwegs durch den PROTAC BSJ-4-116

Zusätzlich zu Flavopiridol und THZ531 wurden in dieser Arbeit die zellulären Effekte des PROTACs BSJ-4-116 untersucht. Initial wurde die dosisabhängige Funktionsweise des PROTACs in HCT116 Zellen und HeLa Zellen, die mit Konzentrationen von 50 nM bis 10 μ M für 24 h mit BSJ-4-116 behandelt wurden, evaluiert. Parallel wurden Zellen für 24 h mit DMSO behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopiert und geerntet. Die geernteten Zellen wurden lysiert und die Lysate für Proteindetektionen im Western Blot eingesetzt. Die Mikroskopie-Aufnahmen (Abb. 4.32) deuteten darauf hin, dass der PROTAC einen starken Effekt auf die Zellproliferation hatte. Bereits 50 nM genügten, um die Zellzahl deutlich zu verringern. Je höher die eingesetzte Dosis war, desto geringer war die Anzahl an lebenden Zellen. Des Weiteren trat eine dosisabhängige Veränderung der Morphologie der Zellen auf und es wurden vermehrt tote Zellen beobachtet. Dies ließ darauf schließen, dass der PROTAC einen anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekt auf die Zellen hatte. Die Western Blot Analyse (Abb. 4.32) zeigte, dass CDK12 dosisabhängig degradiert wurde. Für HeLa Zellen reichte eine Konzentration von lediglich 50 nM aus, um eine deutliche Reduktion der CDK12 Proteinmenge herbeizuführen. In HCT116 Zellen führte die Behandlung der Zellen mit 100 nM BSJ-4-116 ebenfalls zu einer eindeutigen Degradation von CDK12. Auf die Gesamtproteinmenge von Pol II hatte der Inhibitor in HCT116 Zellen keinen Einfluss. In HeLa Zellen war die Pol II Gesamtproteinmenge reduziert, wenn die Zellen mit mindestens 1 μ M BSJ-4-116 behandelt wurden. Die Phosphorylierungen der CTD von Pol II nahmen hingegen dosisabhängig ab. 50 nM genügten, um eine starke Reduzierung der (S2)-Phosphorylierung von Pol II in HeLa Zellen herbeizuführen. Die Phosphorylierung von (S5)-Pol II war hingegen erst reduziert, wenn mindestens 500 nM BSJ-4-116 eingesetzt wurden. In HCT116 mussten insgesamt höhere Konzentrationen eingesetzt werden, um diese Effekte zu erzeugen. Eine eindeutige Abnahme der (S2)- und (S5)-Phosphorylierung von Pol II trat bei einer Konzentration von 500 nM ein. Des Weiteren zeigte die Western Blot Analyse, dass die Menge an *cleaved* PARP (c-PARP) in HeLa Zellen dosisabhängig zunahm. Auch in HCT116 Zellen konnte c-PARP detektiert werden, allerdings nur bei Konzentrationen von 500 nM und 1 μ M. Dies untermauerte die Vermutung, dass der Inhibitor einen pro-apoptotischen Effekt auf die Zellen hatte. Die Detektion der Proteine β -Actin und Actinin dienten dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung.

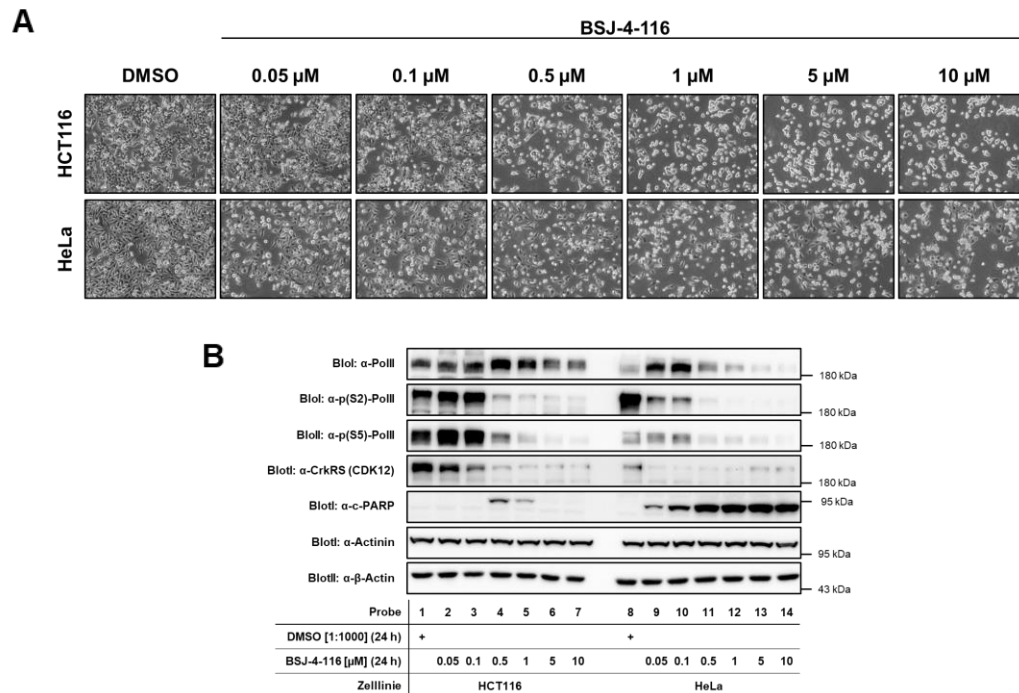


Abb. 4.32 Die Dosisabhängigkeit des PROTACs BSJ-4-116.

HCT116 Zellen und HeLa Zellen wurden für 24 h mit dem PROTAC BSJ-4-116 behandelt. Dabei wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M. Weitere Zellen wurden für die Lösungsmittelkontrolle für 24 h mit DMSO behandelt. Die Zellen wurden anschließend (A) mikroskopiert (Vergrößerung: 10 x) und (B) geerntet, lysiert und die Gesamtzelllysate für Proteindetektionen im Western Blot verwendet. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt.

4.2.1 Einfluss des PROTACs BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 induzierte Genexpression in HCT116 und HeLa Zellen

Um den Einfluss der durch BSJ-4-116 herbeigeführten Degradation von CDK12 auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 induzierte Genexpression zu untersuchen, wurden HCT116 Zellen und HeLa Zellen für insgesamt 24 h mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden als Kontrolle mit DMSO behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h und 3 h mit IL-1 stimuliert oder unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die Zellen mikroskopiert und geerntet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert und das entstandene Lysat wurde für Proteindetektionen im Western Blot verwendet. Aus den restlichen Zellen wurde die RNA für anschließende RT-qPCRs isoliert.

Die Mikroskopie-Aufnahmen (Abb. 4.33) dienen einer Kontrolle und zeigten erneut, dass die Behandlung der Zellen mit 500 nM BSJ-4-116 zu einer verringerten Zellzahl und einer erhöhten Anzahl an apoptotischen Zellen führte. Des Weiteren wurde eine stark veränderte Morphologie der Zellen festgestellt.

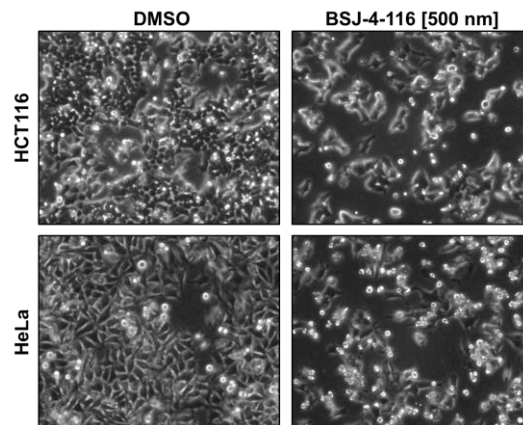


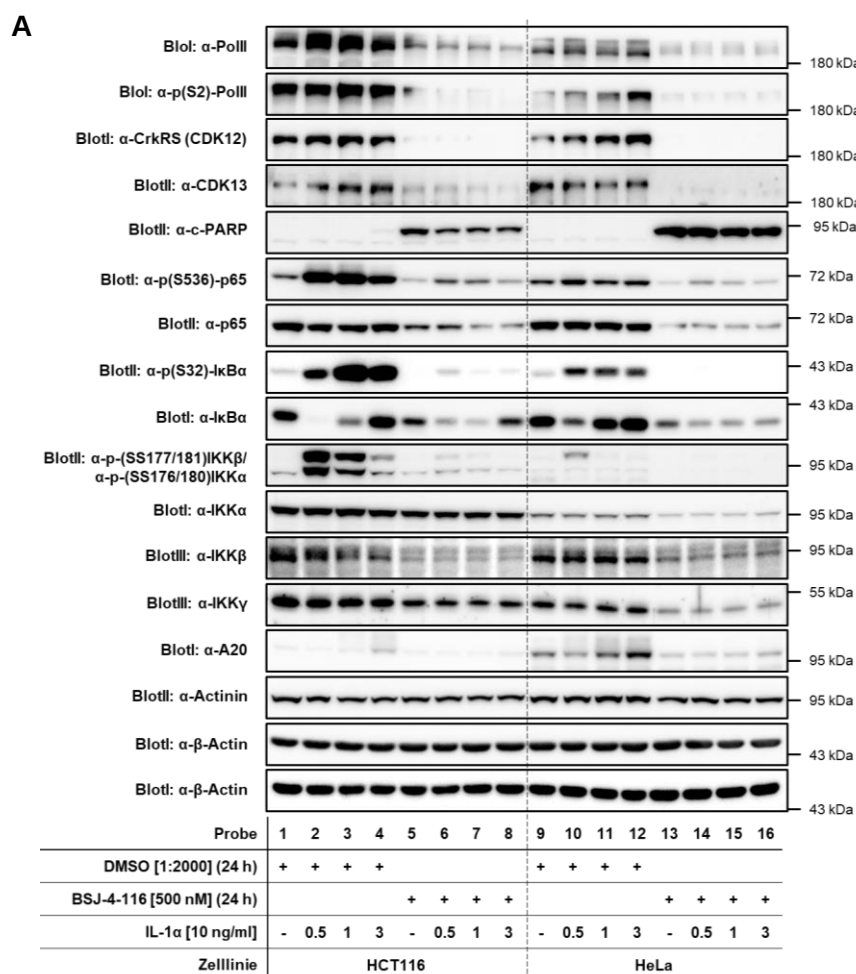
Abb. 4.33 Anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte des PROTACs BSJ-4-116

HCT116 Zellen und HeLa Zellen wurden für 24 h mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen mikroskopiert (Vergrößerung: 10 x).

Die Detektion von CDK12 im Western Blot (Abb. 4.34) zeigte, dass die Behandlung der Zellen mit 500 nM BSJ-4-116 zu einer immensen Reduktion der Gesamtproteinmenge von CDK12 führte. Allerdings zeigte die Analyse, dass auch die Proteinmenge von CDK13 stark verringert war. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass der PROTAC nicht spezifisch für CDK12 war. Die homologe Kinase CDK13 wurde ebenfalls degradiert. Die Detektion von c-PARP, einem bekannten Apoptosemarker, verdeutlichte, dass der PROTAC die Apoptose der Zellen induzierte. Sowohl die Gesamtproteinmenge von Pol II als auch die Phosphorylierung von (S2)-Pol II wurde durch die Behandlung der Zellen mit BSJ-4-116 verringert. Um den Einfluss der CDK12/13 Degradation auf den IL-1 Signalweg zu analysieren, wurden einige Komponenten des Signalwegs detektiert. Die Western Blot Analyse zeigte, dass die Phosphorylierung von p65 in beiden Zelllinien sowohl basal als auch nach erfolgter IL-1 Stimulation im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen reduziert war. Auch die Gesamtproteinmenge von p65 war verringert. Des Weiteren deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die IL-1 induzierte Phosphorylierung von I κ B α in beiden Zelllinien zu jedem Zeitpunkt vermindert war. Bereits in unstimulierten Zellen war die I κ B α -Phosphorylierung im Vergleich zur DMSO Kontrolle reduziert. Auch die basale Gesamtproteinmenge von I κ B α war in beiden Zelllinien verringert, während der Abbau und die Re-Synthese von I κ B α abgeschwächt waren. In HeLa Zellen fand nach 3 h IL-1 Stimulation keine Re-Synthese von I κ B α statt, wie es in den DMSO behandelten Zellen der Fall war. In HCT116 Zellen wurde hingegen die Ausgangsproteinmenge (nach BSJ-4-116-Behandlung) von I κ B α nach 3 h IL-1 Stimulation wieder erreicht. Allerdings war die Proteinmenge gegenüber DMSO behandelten Zellen weiterhin verringert. I κ B α wird durch den sogenannten I κ B-Kinase (IKK) Komplex phosphoryliert. Der IKK-Komplex wird wiederum durch eine Phosphorylierung aktiviert. Die Analyse demonstrierte, dass durch BSJ-4-116 bereits die IL-1 vermittelte Phosphorylierung von IKK α und IKK β supprimiert wurde. Außerdem waren die Gesamtproteinmengen von IKK α , IKK β und IKK γ in HeLa Zellen verringert. In HCT116 Zellen war lediglich die IKK β -Menge

reduziert. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass BSJ-4-116 einen starken Einfluss auf wichtige Komponenten des IL-1 Systems hatte. Auch die IL-1 induzierte Synthese des NF- κ B Inhibitors A20 wurde durch die Behandlung beider Zelllinien mit 500 nM BSJ-4-116 im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen verringert. Als Ladekontrolle der SDS-Gele diente die Detektion von β -Actin und Actinin. Die Quantifizierung der Blots aus drei biologischen Replikaten (Abb. 4.34) wurde anhand der Intensitäten der Chemilumineszenz bemessen und auf diese normalisiert.

Die Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR (Abb. 4.35) zeigte außerdem, dass die IL-1 induzierte Expression aller getesteten IL-1 Zielgene nach der Behandlung der Zellen mit BSJ-4-116 im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen zu jedem Zeitpunkt weitestgehend supprimiert war. Zudem waren bereits die basalen mRNA Mengen von *IL8*, *CXCL2* und *NFKBIA* in beiden Zelllinien verringert. Zusätzlich zeigten die Daten, dass die Expression von *IKKB* und *IKBK* reduziert war. Diese Gene codieren für die I κ B-Kinasen IKK β und IKK γ . Somit war nicht nur die Expression von IL-1 Zielgenen betroffen, sondern auch die Expression von Genen, welche für Komponenten des IL-1 Signalwegs codieren.



B

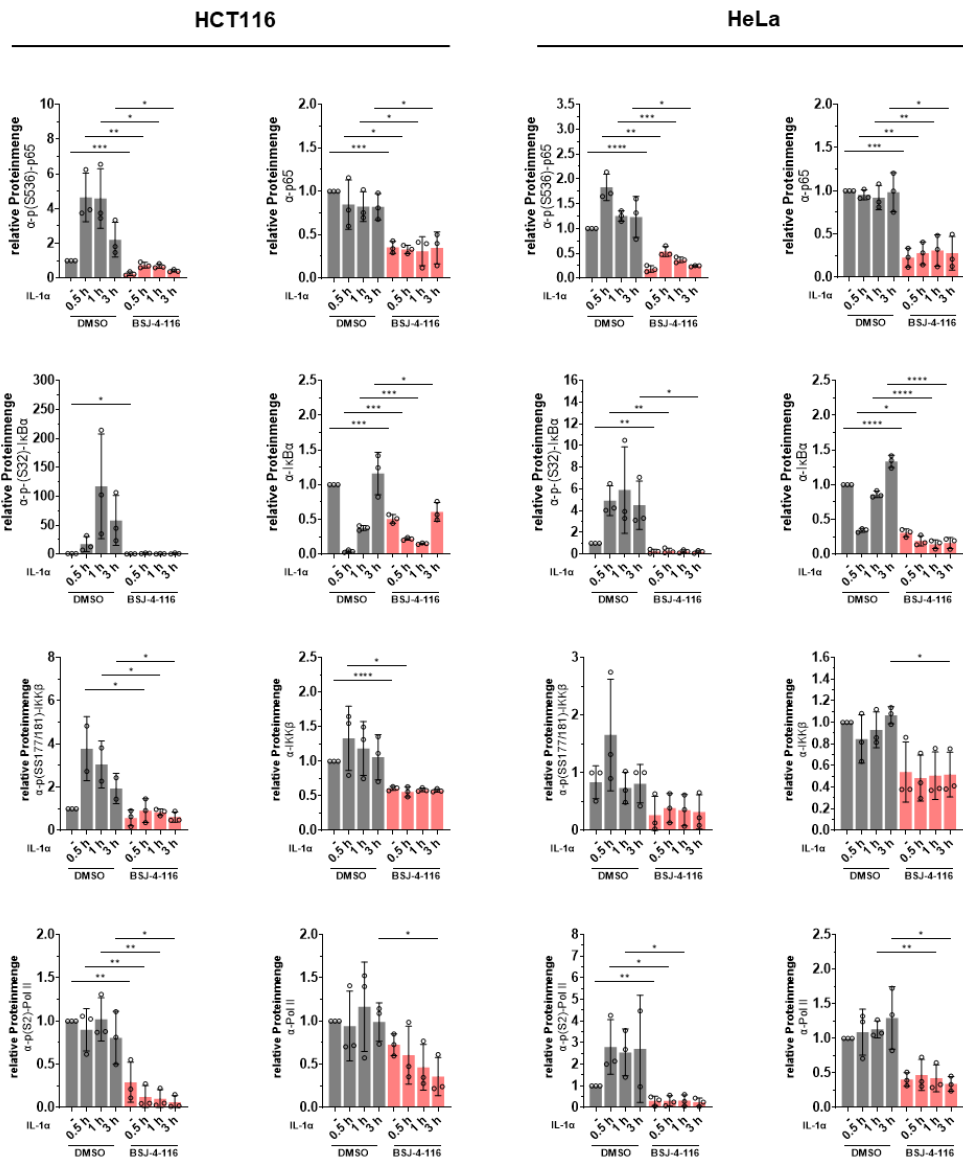


Abb. 4.34 BSJ-4-116 beeinträchtigt den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen und HeLa Zellen immens.

(A) HCT116 Zellen und HeLa Zellen wurden für 24 h mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.05 % DMSO behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen wurden nicht stimuliert. Nach Ablauf der insgesamt 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse zum Einfluss von BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg. Die Proteinmenge wurde auf die unstimulierte, DMSO behandelte Probe der jeweiligen Zelllinie normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

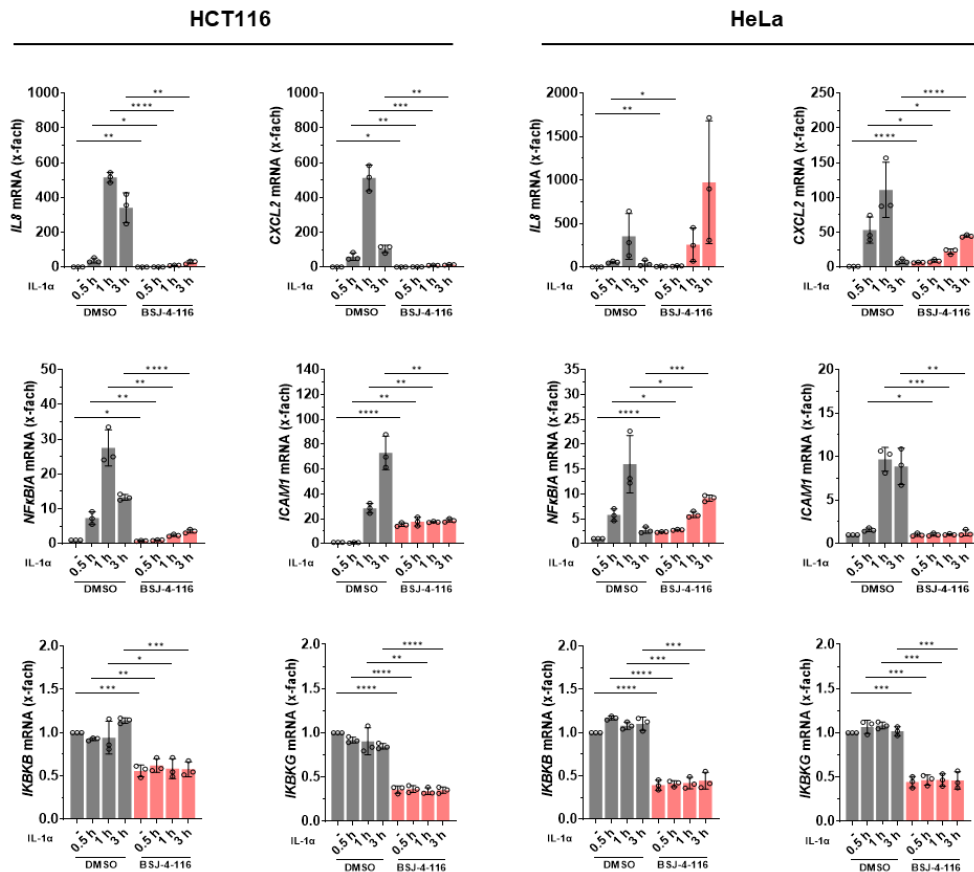


Abb. 4.35 BSJ-4-116 supprimiert die IL-1 induzierte Genexpression in HCT116 Zellen und HeLa Zellen.

(A) HCT116 Zellen und HeLa Zellen wurden für 24 h mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.05 % DMSO behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen wurden nicht stimuliert. Nach Ablauf der insgesamt 24 h wurden die Zellen geerntet. Die RNA der Zellen wurde isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Es wurden Taqman-Sonden für die qPCR verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen ActB und die unstimulierte und DMSO behandelte Probe der jeweiligen Zelllinie. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

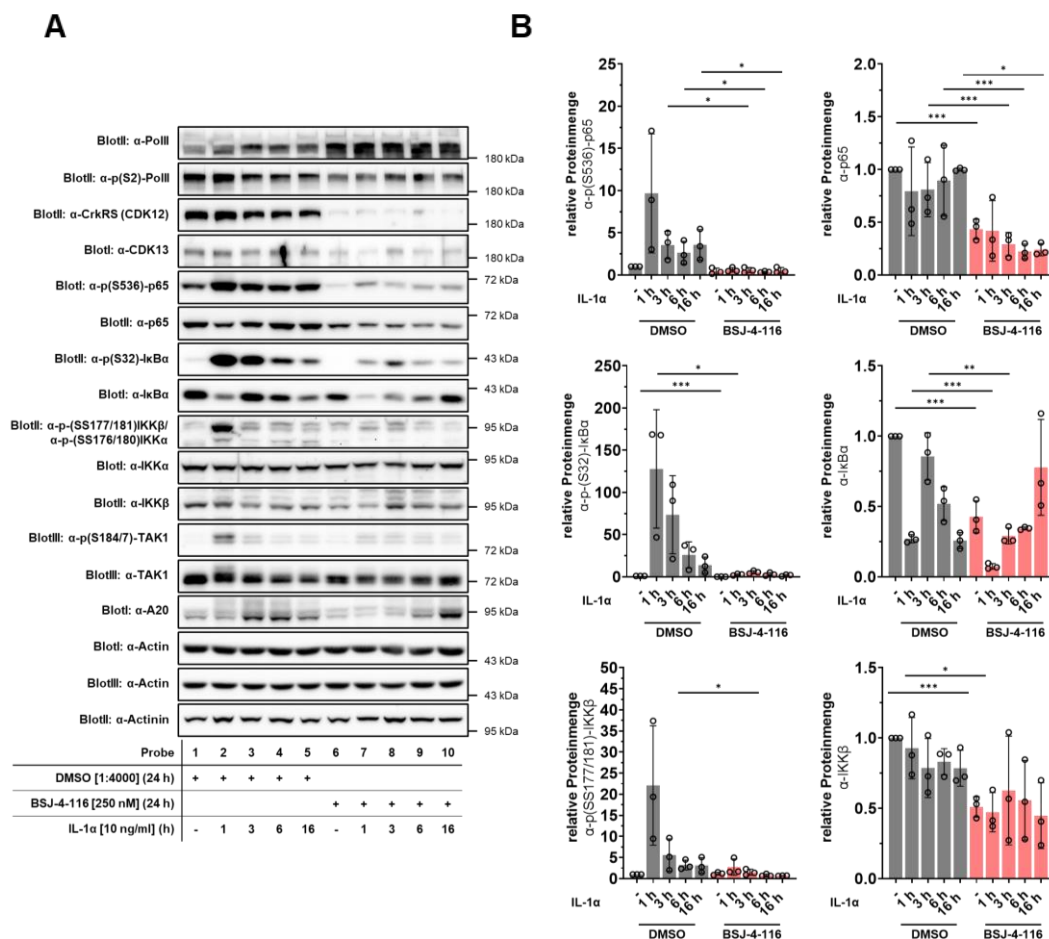
4.2.2 Untersuchungen zur Zeit- und Dosisabhängigkeit PROTACs BSJ-4-116

Da die vorherigen Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die Behandlung der Zellen mit 500 nM BSJ-4-116 nicht nur eine CDK12 Degradation, sondern auch eine CDK13 Depletion induzierte, sollten weiteren Untersuchungen zur Zeit- und Dosisabhängigkeit des PROTACs vorgenommen werden. Zur Analyse der Dosisabhängigkeit wurden die Zellen für 24 h mit lediglich 250 nM BSJ-4-116 behandelt. Die Konzentration wurde somit im Vergleich zum vorherigen Experiment halbiert. Weitere Zellen wurden mit DMSO behandelt. Um eine detaillierte Analyse des Einflusses von BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg durchführen zu können, wurden die Zellen zusätzlich für 1 h, 3 h, 6 h oder 16 h mit IL-1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände der Zellen für Sekretomanalysen geerntet. Die Zellen wurden außerdem für Western Blot Analysen geerntet. Die mittels Bradford Messung bestimmten Proteinkonzentrationen wurden für die Normalisierung der ELISA Analysen verwendet.

Parallel wurden weitere Zellen geerntet, aus welchen die RNA isoliert wurde. Genexpressionsanalysen wurden mittels RT-qPCR durchgeführt.

Die Western Blot Analyse (Abb. 4.36) deutete darauf hin, dass bereits 250 nM BSJ-4-116 ausreichten, um eine Degradation von CDK12 und auch CDK13 herbeizuführen. Allerdings hatte die Behandlung der Zellen mit 250 nM des PROTACs keine Reduzierung der (S2)-Phosphorylierung von Pol II mehr zu Folge. Auch die Gesamtproteinmenge von Pol II blieb unverändert. Mit Blick auf den IL-1 Signalweg wurde gezeigt, dass die IL-1 induzierte Phosphorylierung von p65 zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle reduziert war. Auch die Gesamtproteinmenge von p65 war verringert. Des Weiteren ließen die Ergebnisse darauf schließen, dass die IL-1 induzierte Phosphorylierung von I κ B α stark gehemmt wurde. Auch die Gesamtproteinmenge von I κ B α war reduziert. In DMSO behandelten Zellen wurde I κ B α nach 1 h IL-1 Stimulation degradiert. Nach 3 h IL-1 Stimulation wurde I κ B α bereits re-synthetisiert und die Ausgangsproteinmenge wurde erreicht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die I κ B α Menge 6 h und 16 h nach der IL-1 Stimulation wieder abnahm. Es kommt zu einer Reaktivierung des IL-1 Signalwegs. Wurden die Zellen mit dem PROTAC BSJ-4-116 behandelt, war die basale Proteinmenge von I κ B α bereits verringert. Außerdem zeigte die Analyse, dass I κ B α weiterhin nach 1 h IL-1 Stimulation degradiert wurde, wobei die Proteinmenge weiterhin im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle, welche für 1 h mit IL-1 stimuliert wurde, verringert war. Auch in BSJ-4-116 behandelten Zellen fand eine Re-Synthese von I κ B α statt. Doch im Unterschied zu DMSO behandelten Zellen, nahm die I κ B α Menge nach 6 h und 16 h IL-1 Stimulation weiterhin zu. Auch die IL-1 vermittelte Phosphorylierung von IKK α und IKK β wurde durch die Behandlung der Zellen stark supprimiert. Die Gesamtproteinmenge von IKK β war im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen reduziert. Nach Assemblierung des IL-1 Rezeptorkomplexes aktiviert und phosphoryliert TAK1 beide IKKs. Die Ergebnisse zeigten, dass bereits die IL-1 induzierte Phosphorylierung von TAK1 vermindert war, wenn die Zellen mit BSJ-4-116 behandelt wurden. Die Gesamtproteinmenge von TAK1 blieb unverändert. Dies zeigte, dass eine weitere Komponente des IL-1 Signalwegs, welche *upstream* von den IKKs liegt, durch den PROTAC beeinflusst wurde. Ferner wurde die IL-1 induzierte Synthese von A20/TNFAIP3 verzögert. In DMSO behandelten Zellen, trat die Synthese von A20 nach 3 h IL-1 Stimulation ein. In BSJ-4-116 behandelten Zellen war die Induktion der Synthese erst nach 6 h IL-1 Stimulation zu beobachten. Allerdings war diese im Vergleich zu der DMSO Kontrolle weiterhin reduziert. Nach 16 h IL-1 Stimulation wurde eine erhöhte Proteinmenge von A20 detektiert. Insgesamt waren die Ergebnisse vergleichbar mit vorangegangenen Experimenten, in denen die Zellen mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt wurden. Die Detektion der Proteine β -Actin und Actinin diente dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung. Die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 4.36 B) wurde anhand der Chemilumineszenz-Intensitäten vorgenommen.

Die Genexpressionsanalyse (Abb. 4.36 C) zeigte zusätzlich, dass die IL-1 vermittelte Genexpression von *IL8*, *CXCL2*, *CCL20* und *NFKBIA* zu jedem Zeitpunkt durch die Behandlung der Zellen mit 250 nM BSJ-4-116 reduziert war. Der Vergleich erfolgte dabei mit den DMSO behandelten Kontrollen, welche für dieselbe Zeitspanne mit IL-1 stimuliert wurden. Die beschriebenen Effekte erschienen insgesamt leicht abgeschwächt verglichen zu der Behandlung der Zellen mit 500 nM BSJ-4-116 (Abb. 4.35). Des Weiteren wurden die Proteinkonzentrationen von IL-8, CXCL2 und CCL20 in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt (Abb. 4.36 D). Diese Sekretomanalyse zeigte, dass auch die IL-1 induzierte Sekretion von IL-8, CXCL2 und CCL20 verringert war, wenn HCT116 Zellen mit 250 nM des PROTACs behandelt wurden. In DMSO behandelten Zellen wurden die Zytokine vor allem nach 3 h, 6 h und 16 h IL-1 Stimulation im Zellkulturüberstand detektiert. In BSJ-4-116 behandelten Zellen waren die bestimmten Proteinkonzentrationen zu diesen Zeitpunkten stets reduziert.



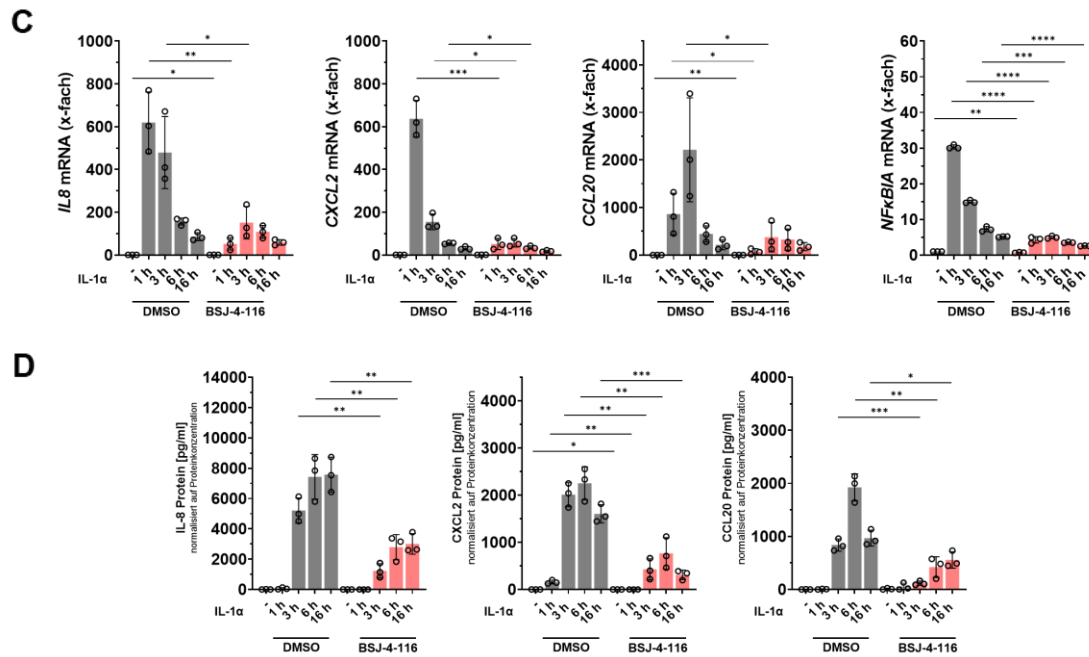


Abb. 4.36 Einfluss von 250 nM BSJ-4-116 auf die IL-1 induzierte Genexpression und Proteinsekretion.

HCT116 Zellen wurden für 24 h mit 250 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.025 % DMSO behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 1 h, 3 h, 6 h oder 16 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Nach Ablauf der insgesamt 24 h wurden die Zellkulturüberstände und die Zellen geerntet. (A) Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse. Die Proteinmenge wurde auf die DMSO behandelte, unstimulierte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. (C) Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR. Es wurden Taqman-Sonden für die qPCR verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen ActB und die unstimulierte und DMSO behandelte Probe. (D) Die Zellkulturüberstände wurden in ELISA-Analysen für IL-8, CXCL2 und CCL20 eingesetzt. Dargestellt sind die anhand den erstellten Standardreihen berechneten Proteinkonzentrationen. Die Werte wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Es sind jeweils die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Um den dosis-abhängigen Einfluss von BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg noch genauer zu charakterisieren, wurde die eingesetzte Konzentration erneut verringert. Statt 250 nM wurden lediglich 100 nM BSJ-4-116 für die Analysen eingesetzt. Somit wurde die Konzentration erneut um den Faktor 2.5 reduziert. HCT116 Zellen wurden für 24 h mit 100 nM BSJ-4-116 behandelt. Bei weiteren Zellen wurde DMSO in das Zellkulturmedium gegeben. Dies diente der Lösungsmittelkontrolle. Zusätzlich wurden die Zellen für 6 h oder 16 h mit IL-1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände für Sekretomanalysen geerntet. Die Zellen wurden ebenfalls geerntet und lysiert. Die Lysate wurden für Proteindetektionen im Western Blot verwendet. Zudem wurde die mittels Bradford Messung erfasste Proteinkonzentration der einzelnen Proben genutzt, um die Sekretomanalyse zu normalisieren.

Die Auswertung der Western Blots (Abb. 4.37) zeigte, dass auch eine Konzentration von 100 nM ausreichte, um die Degradation von CDK12 zu induzieren. Doch auch für die unspezifische Degradation von CDK13 reichte diese Dosis aus. Die (S2)-Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge von Pol II waren nach der Behandlung der Zellen mit 100 nM

BSJ-4-116 unverändert. Dahingegen war die IL-1 induzierte Phosphorylierung von p65 im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen weiterhin reduziert. Außerdem konnte bereits eine Reduktion der Phosphorylierung im basalen Zustand gezeigt werden. Auch die Gesamtproteinmenge von p65 wurde durch die Behandlung der Zellen mit dem CDK12-PROTAC vermindert. Des Weiteren zeigte die Western Blot Analyse, dass die Phosphorylierung von I κ B α in unstimulierten Zellen, welche mit BSJ-4-116 behandelt wurden, im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen reduziert war. Auch die IL-1 induzierte Phosphorylierung von I κ B α war verringert. Allerdings war diese Beobachtung nicht signifikant. Zudem wurde gezeigt, dass die I κ B α -Proteinmenge durch die CDK12/13 Degradation reduziert war. Außerdem war eine Reduktion der IL-1 induzierten Phosphorylierung von IKK β erkennbar. Diese war allerdings nicht signifikant. Die Gesamtproteinmenge von IKK β blieb unverändert. Die IL-1 vermittelte Synthese von A20 war hingegen verringert, wenn die Zellen mit 100 nM BSJ-4-116 behandelt wurden. Insgesamt fielen die Effekte in abgeschwächter Form verglichen zu Zellen, welche mit 250 nM oder 500 nM BSJ-4-116 behandelt wurden, aus. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass bereits 100 nM BSJ-4-116 ausreichten, um die supprimierenden Effekte auf den IL-1 Signalweg herbeizuführen. Die Detektion von β -Actin diente als Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung. Die Quantifizierung der Blots wurde anhand der Chemilumineszenz Intensitäten durchgeführt. Auf diese wurde normiert, um eine relative Proteinmenge zu berechnen.

Die Sekretomanalyse (Abb. 4.37 C) zeigte wiederum, dass die Behandlung der Zellen mit 100 nM BSJ-4-116 keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-8, CXCL2 und CCL20 im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen hatte. Somit reichten 100 nM BSJ-4-116 nicht aus, um die Sekretion der IL-1 induzierten Zytokine zu unterdrücken. Der Einfluss von BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion war stark dosisabhängig.

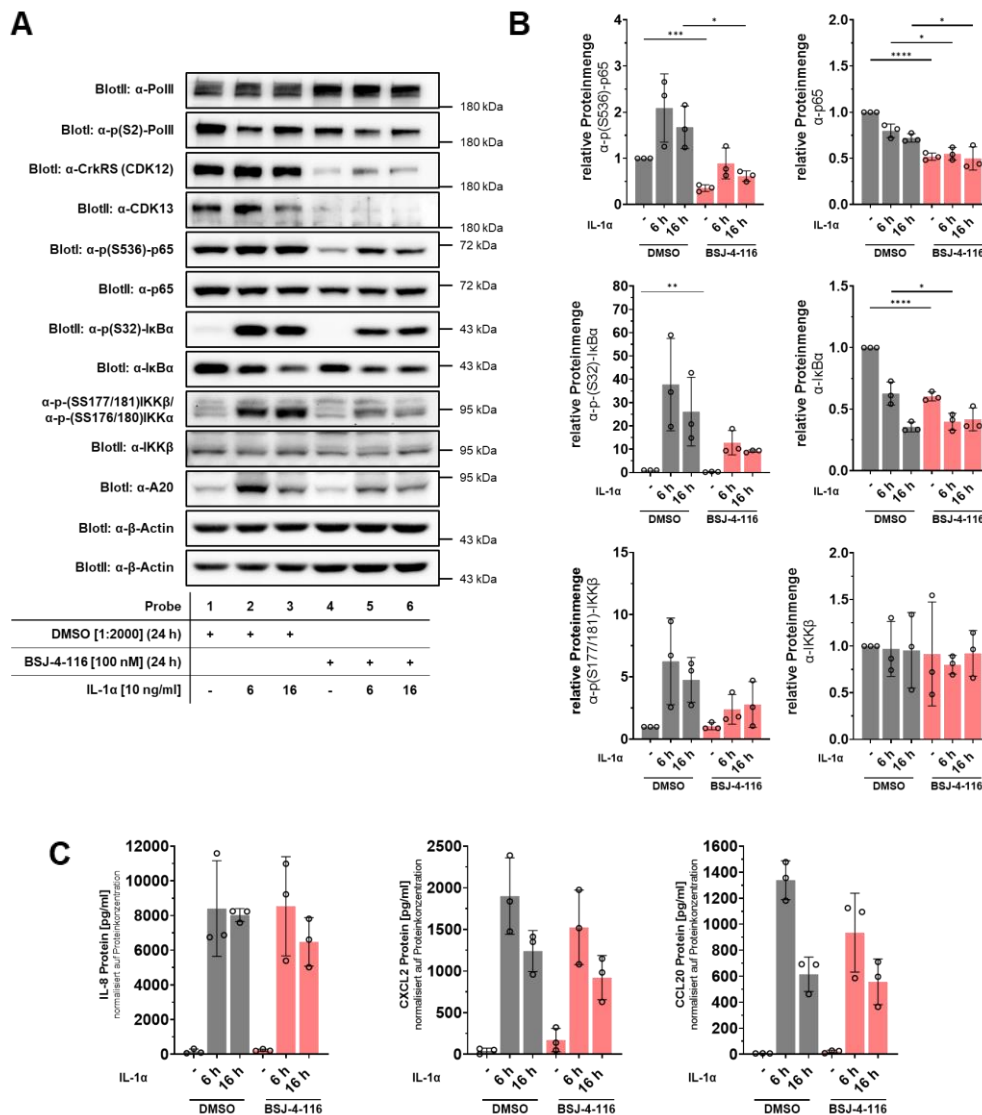


Abb. 4.37 Dosisabhängige Effekte von BSJ-4-116 auf den IL-1 vermittelten Signalweg.

HCT116 Zellen wurden für 24 h mit 100 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.05 % DMSO behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 6 h oder 16 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Nach Ablauf der insgesamt 24 h wurden die Zellkulturüberstände und die Zellen geerntet. (A) Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse. Die Proteinmenge wurde auf die DMSO behandelte, unstimulierte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. (C) Die Zellkulturüberstände wurden in ELISA-Analysen für IL-8, CXCL2 und CCL20 eingesetzt. Dargestellt sind die anhand den erstellten Standardreihen berechneten Proteinkonzentrationen. Die Werte wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Es sind jeweils die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Zusätzlich zur Dosisabhängigkeit sollte auch die Zeitabhängigkeit des PROTACs getestet werden. Dafür wurden HCT116 Zellen für 3 h, 6 h oder 24 h mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden außerdem als Kontrolle mit DMSO behandelt. Um den zeitabhängigen Einfluss des PROTACs zu untersuchen, wurden die Zellen 1 h vor Ablauf der jeweiligen Behandlungszeiten zusätzlich mit IL-1 stimuliert. Weitere Zellen wurden nicht stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert und die entstandenen Gesamtzelllysate wurden für Proteindetektionen im Western Blot eingesetzt.

Der andere Teil der Zellen wurde für Genexpressionsanalysen verwendet. Dafür wurde die RNA der Zellen isoliert und eine reverse Transkription mit anschließender qPCR durchgeführt.

Die Western Blot Analyse (Abb. 4.38) zeigte, dass die Proteinmenge von CDK12 reduziert war, wenn die Zellen für 24 h mit dem CDK12-PROTAC behandelt wurden. Auch die Gesamtproteinmenge von CDK13 war nach der 24-stündigen Behandlung der Zellen verringert. Die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 4.38 B) deutete darauf hin, dass nach 6 h Behandlung die Gesamtproteinmengen von CDK12 und CDK13 ebenfalls in einem geringen Ausmaß reduziert waren. Die Behandlung der Zellen mit BSJ-4-116 für 3 h hatte hingegen keinen Einfluss auf die Proteinmengen von CDK12/13. Somit trat die deutliche Degradation von CDK12/13 erst nach 24 h auf. Die Gesamtproteinmenge von Pol II und vor allem die Phosphorylierung von (S2)- Pol II war allerdings bereits nach 3 h Behandlung mit BSJ-4-116 reduziert. Nach 24 h Behandlung wurde die Phosphorylierung von (S2)- Pol II sogar wieder verstärkt detektiert. Um den Einfluss dieser Zeitabhängigkeit auf den IL-1 Signalweg zu untersuchen, wurden dessen Komponenten im Western Blot detektiert. Die IL-1 induzierte Phosphorylierung der NF- κ B Untereinheit p65 war deutlich reduziert, wenn die Zellen für 24 h mit BSJ-4-116 behandelt wurden und CDK12/13 degradiert war. Auch die basale Phosphorylierung von p65 war nach 24 h Behandlung im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen verringert. Des Weiteren zeigte die Analyse, dass die Gesamtproteinmenge von p65 lediglich nach 24 h Behandlung reduziert war. Dies war sowohl in nicht stimulierten als auch in Zellen, welche für 1 h mit IL-1 stimuliert wurden, der Fall. Wurden die Zellen hingegen für 3 h oder für 6 h mit BSJ-4-116 behandelt, blieb die Gesamtproteinmenge von p65 und auch dessen Phosphorylierung unverändert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die IL-1 induzierte Phosphorylierung von IKK α / β und die Gesamtproteinmenge von IKK β in einem geringeren Ausmaß detektiert wurden, wenn die HCT116 Zellen für 24 h mit BSJ-4-116 behandelt wurden. Nach 3 h und 6 h Inkubationszeit mit dem PROTAC trat hingegen keine Reduktion auf. Diese Effekte waren somit an die Degradation von CDK12/13 gekoppelt, welche ebenfalls erst nach 24 h auftrat. Im Gegensatz zeigte die Analyse, dass die IL-1 vermittelte Phosphorylierung von I κ B α zu jedem Zeitpunkt reduziert war. Bereits 3 h Behandlung genügten, um eine Reduktion der I κ B α -Phosphorylierung zur Folge zu haben. Zusätzlich war die Gesamtproteinmenge von I κ B α zu jedem Zeitpunkt verringert. Auch nach der IL-1 Stimulation und der damit verbundenen Degradation von I κ B α , war die Proteinmenge im Vergleich zu DMSO behandelten und stimulierten Zellen reduziert. Des Weiteren wurde die durch IL-1 induzierte Synthese von A20 bereits nach 3 h BSJ-4-116 im Vergleich zur DMSO Kontrolle supprimiert. Diese Effekte waren somit unabhängig von der Degradation von CDK12/13.

Die Auswertung der RT-qPCR (Abb. 4.38 C) deutete zudem darauf hin, dass die IL-1 vermittelte Expression von *IL8*, *CXCL2*, *NFKBIA* und *CCL20* bereits verringert war, wenn die Zellen für 3 h mit BSJ-4-116 behandelt wurden. Nach 24 h der Behandlung nahmen die mRNA Mengen im Vergleich zur 3 h und 6 h Behandlung weiter ab. Demnach zeigten die Ergebnisse, dass diese supprimierenden Effekte auf die IL-1 induzierte Genexpression teilweise unabhängig von der CDK12/13 Degradation waren. Zusammenfassend zeigten die Daten, dass der PROTAC nicht nur sehr effektiv CDK12 (und CDK13) degradierte, sondern auch multiple, unspezifische *off target* Effekte vor allem im IL-1-NF- κ B System auslöste.

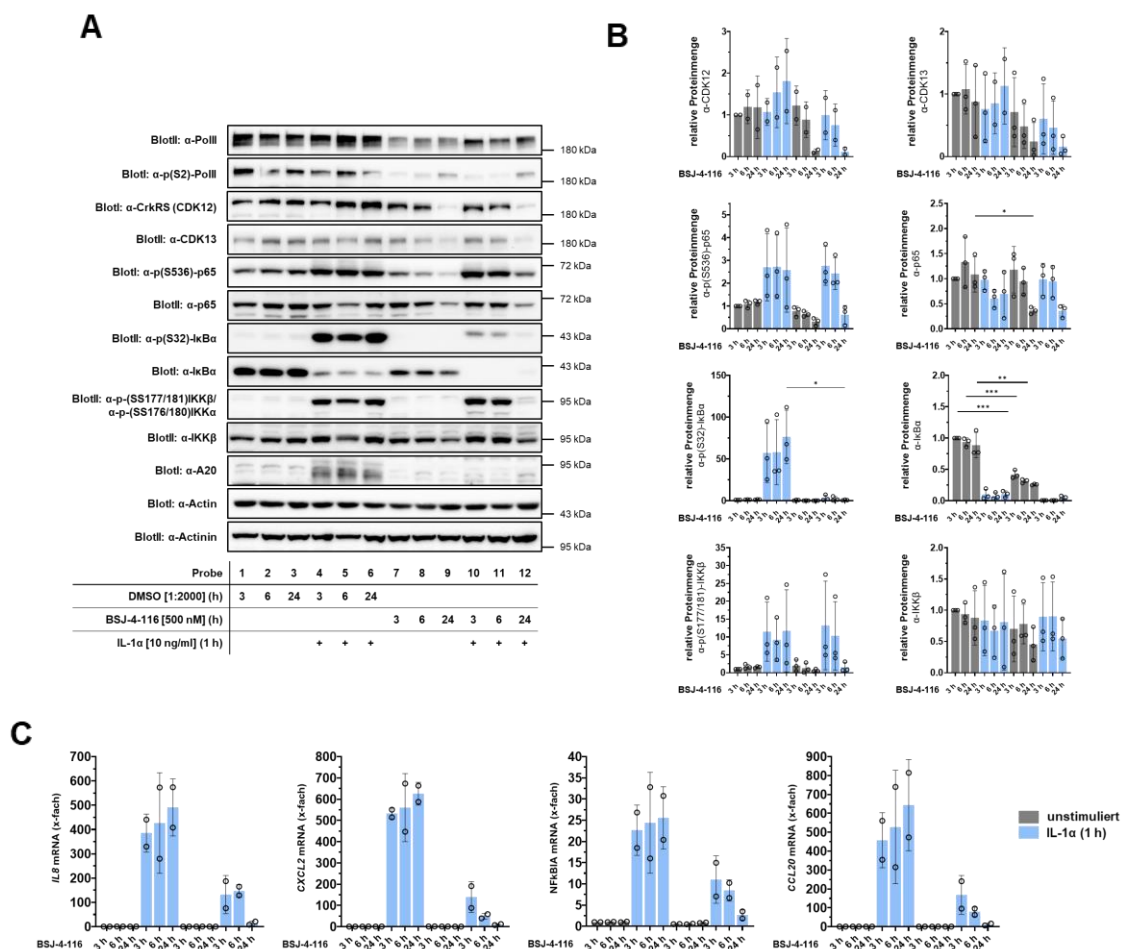


Abb. 4.38 Zeitabhängige Effekte des PROTACs BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen.

HCT116 Zellen wurden für 3 h, 6 h oder 24 h mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt. Weitere Zellen wurden mit 0.05 % des Lösungsmittels DMSO behandelt. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen für 1 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. (A) Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse. Die Proteinmenge wurde auf die für 3 h mit DMSO behandelte, unstimulierte Probe normalisiert. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. (C) Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR. Es wurden Taqman-Sonden verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen ActB und die unstimulierte und für 3 h mit DMSO behandelte Probe. Es sind jeweils die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei (Western Blot) bzw. zwei (RT-qPCR) unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

4.3 Das Auxin-induzierte Degron System zur spezifischen Degradation von CDK12

Um nicht nur die Effekte der transienten Inhibition der enzymatischen Aktivität, sondern auch die Rolle der Proteindomänen von CDK12 zu untersuchen und angesichts der *off target* Effekte des PROTACs BSJ-4-116, wurde im Folgenden ein genetisches Modell als *loss-of-function* Ansatz etabliert. Hierzu wurde das Auxin-induzierte Degron System gewählt. Dieses erlaubte eine spezifische und schnelle Degradation von CDK12. Dieses System basiert auf einem durch Auxin gesteuerten Degradationsweg, der spezifisch in Pflanzen vorkommt. Das Phytohormon Auxin induziert dabei den proteasomalen Abbau bestimmter Transkriptionsrepressoren (Aux/IAA Proteine), welche eine destabilisierende Domäne (ein Degron) in der zweiten Proteindomäne besitzen (Ramos et al., 2011). Das F-Box Protein TIR1 dient dabei als Auxin-Rezeptor (Dharmasiri et al., 2005a). Es bildet einen Komplex mit dem SCF-E3 Ligase Komplex. Bei Anwesenheit von Auxin bindet dieses direkt an TIR1 und sorgt somit für die Interaktion zwischen der E3-Ubiquitin-Ligase und dem Auxin-induzierten Degron (AID). Dies resultiert in der Ubiquitinierung des Transkriptionsrepressors und somit in dessen proteasomalen Abbau (Dharmasiri et al., 2005b; Dharmasiri and Estelle, 2004).

Eukaryotische Zellen besitzen den SCF-Degradationsweg und damit den SCF-E3 Ligase Komplex ebenfalls. Um den beschriebenen Degradationsweg auch in humanen Zellen anwenden zu können, ist eine Integration des Auxin-Rezeptors *TIR1* in das Genom notwendig. Des Weiteren muss dem Zielprotein (in diesem Fall CDK12) ein Degron angefügt werden. Wird daraufhin Auxin zu den Zellen gegeben, erkennt TIR1 das Degron und der proteasomale Abbau des Zielproteins wird eingeleitet (Natsume et al., 2016). Die Funktionsweise des Auxin-induzierten Degron Systems ist in Abb. 4.39 dargestellt.

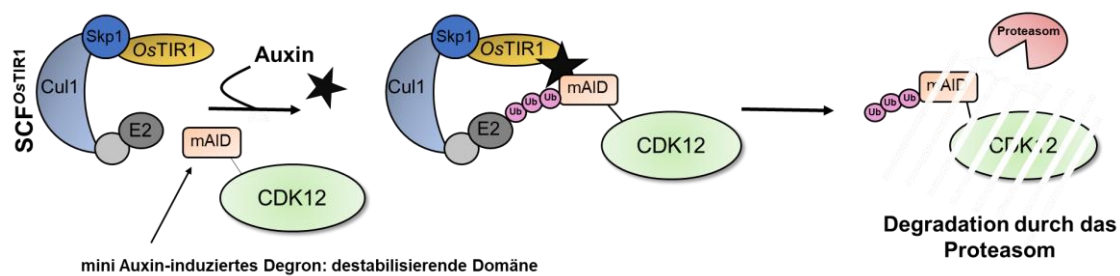


Abb. 4.39 Funktionsweise des Auxin-induzierten Degron Systems.

HCT116 Zellen exprimieren den Auxin-Rezeptor OsTIR1 (aus *Oryza sativa* stammend) unter Kontrolle eines tet-on Promotors. Zusätzlich ist CDK12 mit dem mini-Auxin-induzierten Degron (mAID) fusioniert. In Anwesenheit von Auxin, erkennt OsTIR1 das Degron von CDK12. Dies führt zur Ubiquitinierung von CDK12 durch den SCF E3 Ubiquitin Ligase. Durch die Ubiquitinierung wird die schnelle Degradation durch das Proteasom eingeleitet (basierend auf Natsume et al., 2016).

4.3.1 Etablierung des Auxin-induzierten Degron Systems

Die Etablierung des Auxin-induzierten Degron Systems für eine transiente und schnelle Degradation von CDK12, basierte auf den Arbeiten von Natsume et al., 2016 (Natsume et al., 2016). Der Auxin-Rezeptor *OstTIR1*, welcher aus *Oryza sativa* stammt, wurde unter Verwendung von CRISPR/Cas9 in den *safe harbor* Lokus AAVS1 des Genoms von HCT116 Zellen integriert. Die Zellen exprimieren *OstTIR1* unter der Kontrolle eines *tet-on* Promotors. Die Zugabe von Doxycyclin leitet dabei die Genexpression von *OstTIR1* ein. Doxycyclin ist ein synthetisches Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline. Es dient als Effektormolekül für *tet-on* Systeme. Doxycyclin bindet an einen Transaktivator (das *tet-on* 3G Protein), welcher daraufhin eine Konformationsänderung erfährt. Diese ermöglicht die Bindung an das *tetracycline response element* (TRE) im Promotor (Zhou et al., 2006). Dies führt wiederum zur Aktivierung der Transkription bzw. der Genexpression (Abb. 4.40). Die HCT116 *tet-OstTIR1* Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Schmitz (JLU) bezogen.

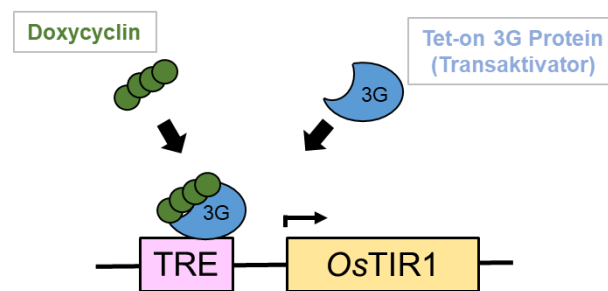


Abb. 4.40 HCT116 Zellen exprimieren *OstTIR1* unter Kontrolle eines *tet-on* Systems.

Doxycyclin bindet bei dessen Anwesenheit an das *tet-on* 3G Protein. Dieses durchläuft daraufhin eine Konformationsänderung, welche die Bindung an das *tetracycline response element* (TRE) ermöglicht. Dadurch wird die Genexpression von *OstTIR1* eingeleitet.

Des Weiteren war es notwendig, CDK12 mit einem mini-Auxin-induzierten Degron (mAID) zu fusionieren. Zu diesem Zweck wurde eine CRISPR/Cas9-basierte *AID-tagging* Methode angewandt (Natsume et al., 2016). Die Endonuklease Cas9 ist der enzymatische Teil des CRISPR/Cas9 Systems. Sie induziert einen durch eine *single guide* RNA (sgRNA) geleiteten Doppelstrangbruch. In diesem Fall sollte das Degron an den N-Terminus von CDK12 fusioniert werden, sodass sgRNAs gewählt wurden, welche in der Nähe des Stopp-Codons lagen. Um den gezielten Doppelstrangbruch herbeizuführen, wurden die sgRNAs in einen Vektor kloniert, welcher für die Endonuklease Cas9 codiert. Es wurden dabei zwei verschiedene sgRNAs verwendet, welche den Bereich um das Stopp-Codon von CDK12 flankierten (Abb. 4.42). Der Cas9-codierende Vektor pX330 wurde über Bpil geöffnet und die vorher hybridisierten sgRNAs wurden in den Vektor ligiert (Abb. 4.41). Die Sanger-Sequenzierung zeigte, dass die sgRNAs erfolgreich in den pX330-Vektor kloniert wurden (Abb. 4.41 B).

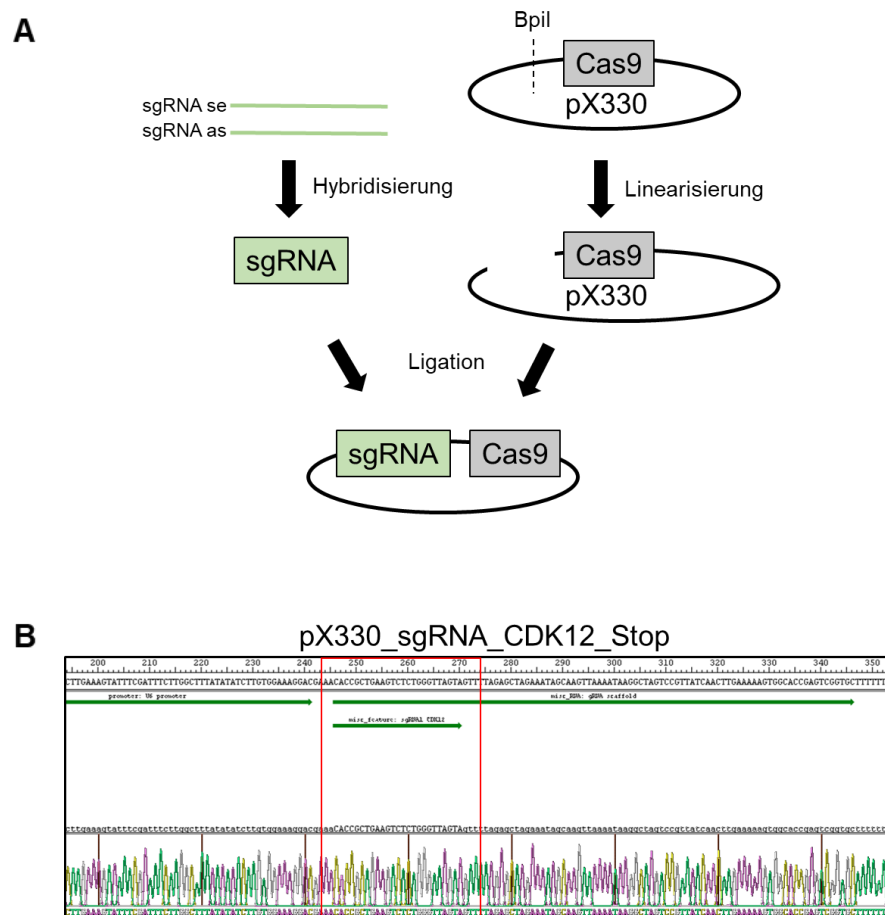


Abb. 4.41 Klonierung der sgRNAs in den Cas9-codierenden Vektor pX330.

(A) sgRNAs wurden nach deren Hybridisierung in den über BpiI linearisierten pX330 Vektor ligiert. (B) Die Sanger-Sequenzierung zeigt den erfolgreichen Einbau der sgRNA in den Vektor.

Der durch Cas9-induzierte Doppelstrangbruch wird von der Zelle über homologe Rekombination repariert. Um die Degron-Domäne in das Genom einzuführen, wurden Donorvektoren benötigt, welche als Vorlage für die DNA-Reparatur dienten. Die Donorvektoren bestanden zum einen aus Homologiearmen, welche den Bereich 175 bp *upstream* und 175 bp *downstream* des Stopp-Codons von CDK12 abdeckten. Über Basenpaarung der Homologiearme mit dem endogenen Locus sollte der jeweilige Donorvektor zu dem Cas9-induzierten Doppelstrangbruch geleitet werden. Der pUC57-Kan Vektor mit den Homologiearmen wurden von Biocat bezogen (pUC57-Kan CDK12-HAS) (Abb. 4.42). Die beiden Homologiearme waren dabei über eine BamHI-Schnittstelle verbunden. Die Vektoren, welche die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten besaßen, wurden von Addgene bezogen. Es wurden zwei unterschiedliche Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) verwendet, um später den bi-allelen Einbau in das Genom garantieren zu können. Mittels enzymatischer Restriktion durch BamHI wurden die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten aus den Addgene-Vektoren ausgeschnitten. Über eine Agarose-Gelelektrophorese wurden die Inserts vom restlichen Vektor getrennt. Das Agarose-Gel wurde mittels Methylblau anfärbt und die jeweiligen mAID-(mClover)-Resistenzkassetten ausgeschnitten.

Anschließend wurde die DNA aufgereinigt (Abb. 4.43). Schlussendlich wurden die aufgereinigten mAID-(mClover)-Resistenzkassetten in den über BamHI geöffneten pUC57-Kan CDK12-HAS Vektor ligiert (Abb. 4.44). Somit befand sich die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten zwischen den beiden Homologiearmen.

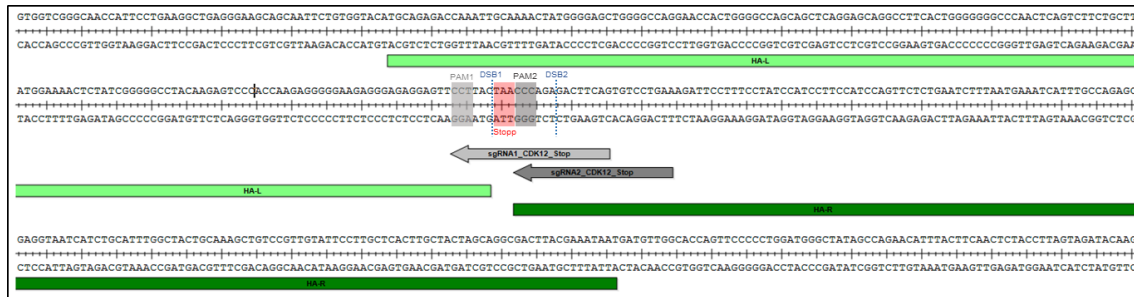


Abb. 4.42 Schematische Darstellung des Insertionsbereichs für die Komponenten des Degron Systems am endogenen *CDK12* Lokus.

Dargestellt ist der Bereich des Stopp-Codons (rot) im letzten Exon des *CDK12* Lokus. Die zwei verschiedenen sgRNAs, welche den Bereich um das Stopp-Codon flankieren, sind in grau dargestellt. Diese sgRNAs dienen der Rekrutierung von Cas9. Die Homologie-Arme (grün) decken den Bereich 175 bp *upstream* und 175 bp *downstream* des Stopp-Codons (rot) von *CDK12* ab.

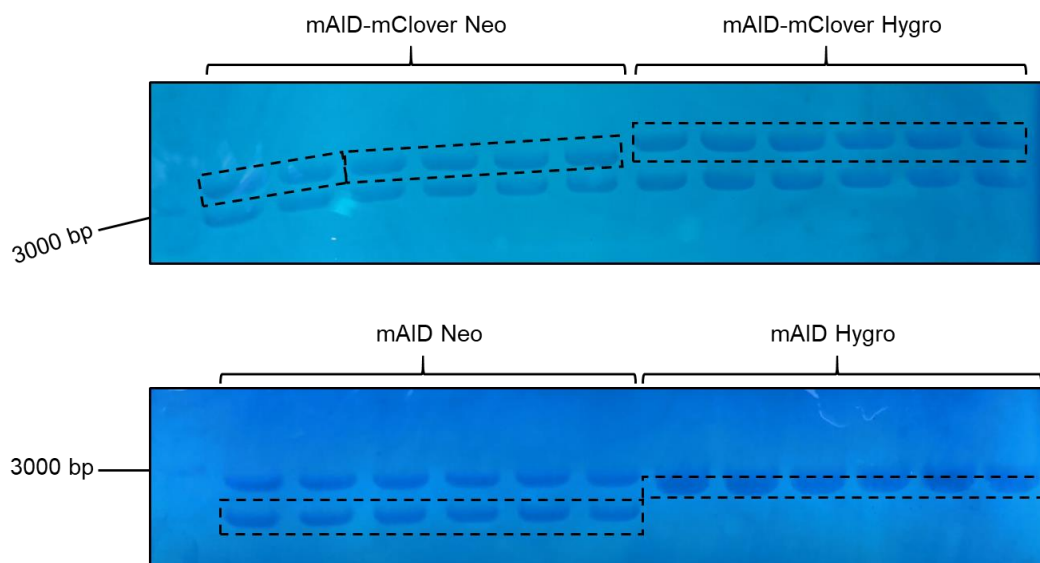


Abb. 4.43 Ausschneiden der mAID-(mClover)-Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) aus den entsprechenden Addgene-Donorvektoren.

Mittels enzymatischer Restriktion durch BamHI wurden die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) aus den entsprechenden Addgene-Donorvektoren ausgeschnitten. Je Addgene-Vektor wurden sechs Reaktionsansätze erstellt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung von Vektor und Insert. Nach Methylenblau-Färbung des Gels wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten (gestrichelte Linie). Aufgrund der nahezu identischen Größe von Insert und Vektor für die mAID-Hygro-Kassette, wurden hier beide Banden ausgeschnitten. Insert-Größen: mAID-mClover-Neo = 3243 bp, mAID-mClover-Hygro = 3511 bp, mAID-Neo = 2519 bp, mAID-Hygro = 2788 bp; Neo: Geneticin/Neomycin, Hygro: Hygromycin.

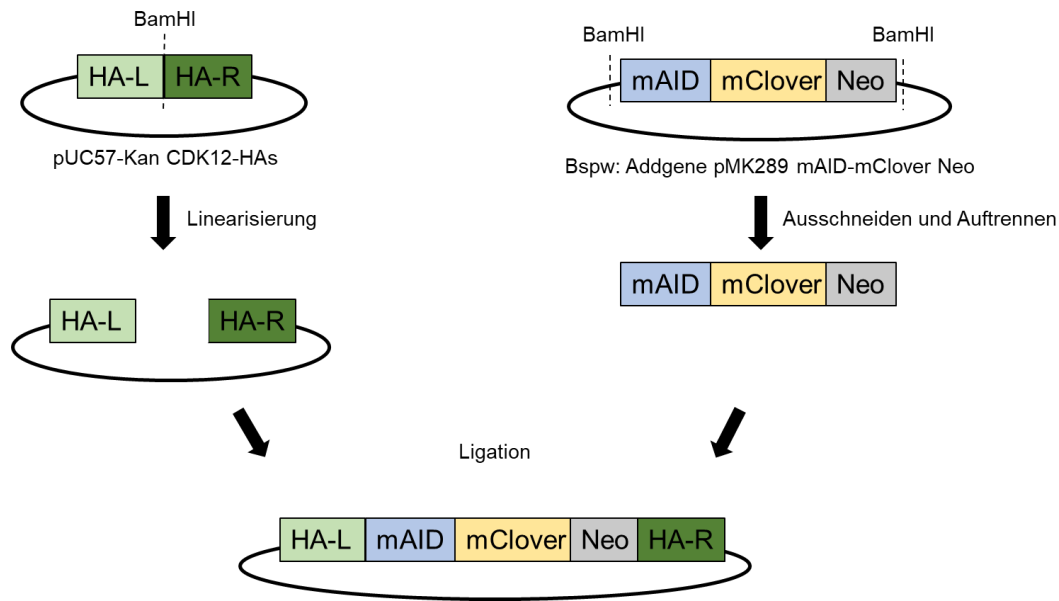


Abb. 4.44 Klonierung der mAID-(mClover)-Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) in den pUC57-Kan-CDK12-HAS Vektor.

Der pUC57-Kan-CDK12-HAS Vektor wurde zwischen den beiden Homologiearmen über BamHI linearisiert. Mittels enzymatischer Restriktion durch BamHI wurden die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) aus den entsprechenden Addgene-Donorvektoren ausgeschnitten. Nach Auftrennung der Inserts vom restlichen Vektor wurden die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten aufgereinigt und in den linearisierten pUC57-Kan-CDK12-HAS Vektor ligiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurden die Vektoren bakteriell amplifiziert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus einzelnen gewachsenen Bakterienklonen isoliert und aufgereinigt. Um den erfolgreichen Einbau der mAID-(mClover)-Resistenzkassetten in den pUC57-Kan-CDK12-HAS Vektor überprüfen zu können, wurden die Vektoren erneut über BamHI enzymatisch geschnitten. Im Anschluss wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 4.45). Die Plasmid-DNA der Klone, welche Insert und Vektor mit den erwarteten Größen zeigten, wurden zudem sequenziert (Abb. 4.45). Aufgrund der ähnlichen Größe von Insert und Vektor wurden für pUC57-Kan-CDK12-HAS_mAID-Hygro zufällig einige Klone gewählt.

Insgesamt wurden sechs verschiedene Vektoren erzeugt, die für die Etablierung des Auxin-induzierten Degron Systems benötigt wurden (Abb. 4.46). Zum einen wurden zwei verschiedene Vektoren erzeugt, welche sowohl eine sgRNA besaßen als auch für die Endonuklease Cas9 codierten. Dieser Vektor wurde benötigt um einen Cas9-induzierten Doppelstrangbruch in Nähe des Stopp-Codons herbeizuführen. Als DNA-Reparatur-Vorlage wurden zudem Donorvektoren benötigt. Über die Homologiearme wird der Vektor zu dem von Cas9 eingeführten Doppelstrangbruch geleitet. Die Vektoren, welche die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten besitzen, werden daraufhin von der homologen Rekombination der Zellen als Vorlage für die Reparatur verwendet. Dadurch wird das Degron und eine Antibiotikaresistenz hinter dem letzten Codon von CDK12 in das Genom integriert. Es wurden zwei verschiedene Antibiotikaresistenzen (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) verwendet,

um auf eine bi-allele Integration *screenen* zu können. Außerdem wurden Vektoren generiert die lediglich für mAID codierten, aber auch Vektoren, die zusätzlich für das Fluoreszenzprotein mClover codierten. Somit wurden insgesamt sechs Vektoren erfolgreich kloniert.

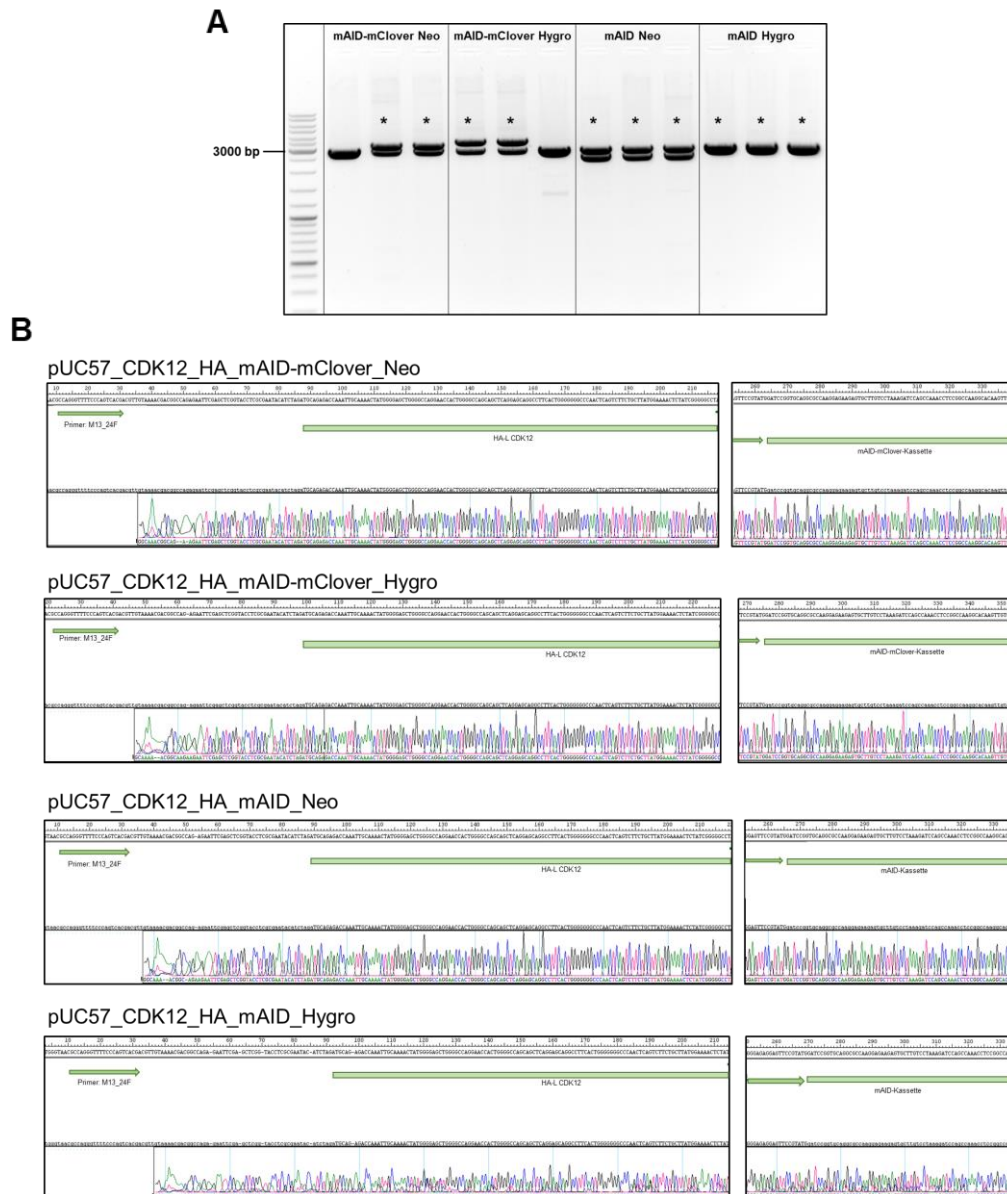


Abb. 4.45 Überprüfung des erfolgreichen Einbaus der mAID-(mClover)-Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) in den pUC57-Kan CDK12-HAS Vektor.

Nach erfolgter Klonierung wurde die Plasmid-DNA bakteriell amplifiziert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA einzelner Bakterienklone isoliert und aufgereinigt. (A) Der aufgereinigte Vektor wurde erneut über enzymatische Restriktion durch BamHI verdaut. Dabei sollte gezeigt werden, ob sich die mAID-(mClover)-Resistenzkassetten ausschneiden lassen. Die Auftrennung der Produkte erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Insert-Größen: mAID-mClover-Neo = 3242 bp, mAID-mClover-Hygro = 3511 bp, mAID-Neo = 2519 bp, mAID-Hygro = 2788 bp, Vektoren mit HAS: 2895 bp. (B). Die Plasmid-DNA der Klone, welche Inserts und Vektoren mit den erwarteten Größen zeigten (*), wurden zudem unter Verwendung des Primers M13-24F sequenziert. Aufgrund der ähnlichen Größe von Insert und Vektor wurden für pUC57-Kan CDK12-HAS_mAID-Hygro zufällig einige Klone gewählt. Gezeigt ist Sequenz von der Primer-Bindestelle bis zum linken Homologiearm (HA-L). Des Weiteren ist die Sequenz zu Beginn der mAID-(mClover)-Kassette gezeigt. Die Sequenzierergebnisse wurden über DNASTar visualisiert.

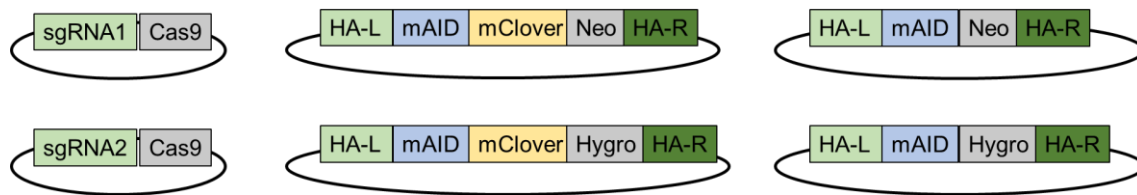


Abb. 4.46 Benötigte Vektoren für die Etablierung eines Auxin-induzierten Degron Systems.

Es wurden zwei Vektoren generiert, welche sowohl eine sgRNA besitzen als auch für die Endonuklease Cas9 codieren. Diese Vektoren werden benötigt, um den sgRNA-gerichteten Doppelstrangbruch in Nähe des Stopp-Codons herbeizuführen. Des Weiteren wurden Donorvektoren erzeugt. Diese bestehen aus zwei Homologiearmen, welche den Bereich 175 bp *upstream* und 175 bp *downstream* des Stopp-Codons von *CDK12* abdeckten. Über Basenpaarung der Homologiearme mit dem endogenen Locus sollte der Donorvektor zu dem Cas9-induzierten Doppelstrangbruch geleitet werden. Zwischen die Homologiearme wurden die verschiedenen mAID-(mClover)-Resistenzkassetten eingeführt. Dabei wurden Vektoren erzeugt, welche lediglich für mAID codierten, aber auch Vektoren, welche zusätzlich für das Fluoreszenzprotein mClover codierten. Zudem wurden zwei verschiedene Antibiotikaresistenzen verwendet, um die bi-allele Integration in das Genom versichern zu können.

Im Anschluss an die Klonierung der benötigten Vektoren, wurden die HCT116 tet-OsTIR1 Zellen unter Verwendung von linear PEI mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Dabei wurden die Zellen mit einem der beiden erzeugten pX330 Vektoren, welche die sgRNA enthielten, transfiziert (pX330_sgRNA1_CDK12 **oder** pX330_sgRNA2_CDK12). Gleichzeitig wurden die Zellen mit zwei Donorvektoren transfiziert. Ein Vektor trug dabei die Hygromycin-Resistenz während der andere Vektor eine Neomycin-Resistenz besaß. Entweder wurden die beiden Vektoren verwendet, welche lediglich für mAID codierten oder die Vektoren, welche zusätzlich für mClover codierten (pUC57-Kan_CDK12_mAID Neo & pUC57-Kan_CDK12_mAID Hygro **oder** pUC57-Kan_CDK12_mAID-mClover Neo & pUC57-Kan_CDK12_mAID-mClover Hygro). Weitere Zellen wurden zur Kontrolle mit dem pX330 Leervektor und den entsprechenden Donorvektoren transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen passagiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt. Dem Kulturmedium wurden nun 700 µg/ml Geneticin Sulfate G418 und 100 µg/ml Hygromycin B Gold zugesetzt. Das Selektionsmedium wurde alle 2 – 3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden für insgesamt vier Wochen dauerselektiert. Die Leervektor-Kontrollen waren zu diesem Zeitpunkt vollständig abgestorben.

Um monoklonale Zellen zu erhalten, wurden 100 selektierte Zellen in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 10 Tagen waren die Kolonien mit bloßem Auge an der Schalenunterseite erkennbar, so dass die Monoklone gepickt werden konnten. Die Zellen wurden dabei in 96-Well Platten gepickt. Nach einigen Tagen wurde die 96-Well Platte dupliziert. Die Zellen einer Platte wurden eingefroren, während die Zellen der zweiten Platte zur Genotypisierung der einzelnen Monoklone verwendet wurde (Yesbolatova et al., 2019). Nach erfolgter Genotypisierung der einzelnen Klone über Standard-PCR und Agarose-Gelelektrophorese, wurden die Monoklone, welche einen erfolgreichen Einbau der mAID-(mClover)-Resistenzkassette zeigten, aufgetaut und expandiert. Anschließend erfolgten weitere Charaktarisierungen.

Einige hochgezogene Monoklone wurden geerntet und die DNA der Zellen wurde isoliert. Anschließend wurde unter Verwendung der GoTaq-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese die Integration der jeweiligen Kassetten nachgewiesen (Abb. 4.47). Der Bereich vom endogenen *CDK12* bis zur Sequenz, welche für das mAID oder für das fluoreszierende Protein mClover codiert, wurde erfolgreich amplifiziert. Des Weiteren wurden die Amplifikate von den Sequenzbereichen der jeweiligen Resistenzkassetten bis zum endogenen *CDK12* generiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.47 beispielhaft für einige der Monoklone dargestellt. Durch die erfolgreiche Amplifizierung beider Resistenzkassetten konnte sichergestellt werden, dass die mAID-mClover-Resistenzkassette an beiden Allelen der HCT116 tet-OsTIR1 Zellen in das Genom integriert wurden.

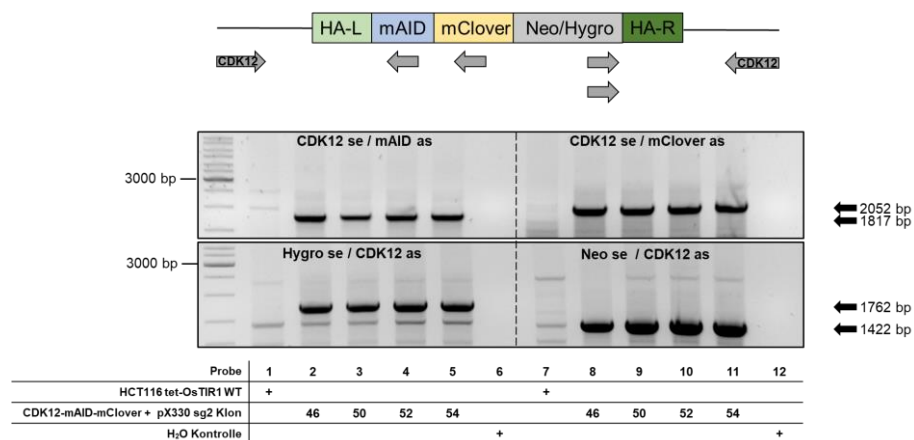


Abb. 4.47 Genotypisierung der HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover Monoklone zur Überprüfung der erfolgreichen Etablierung des Degron Systems.

HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #46, #50, #52 und #54 wurden nach erfolgter Expansion geerntet. Zusätzlich wurden HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen geerntet. Die DNA aller Zellen wurde isoliert. Für die GoTaq-PCR wurde ein *sense* Primer, welcher am endogenen *CDK12* bindet, in Kombination mit *antisense* Primern, welche die mAID- oder die mClover codierende Sequenz binden, verwendet (oben). Weiterhin wurden *sense* Primer eingesetzt, welche die jeweilige Resistenzkassette (Hygromycin oder Neomycin) binden. Diese Primer wurden kombiniert mit einem *antisense* Primer, der das endogene *CDK12* bindet (unten). Die entsprechenden Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese visualisiert.

Des Weiteren wurde der Bereich vom endogenen *CDK12* bis zur Sequenz, welche für das mAID codiert (CDK12_se / mAID_as), und der Bereich von der Sequenz, die für die Neomycin-Resistenz codiert, bis zum endogenen *CDK12* (Neo_se / CDK12_as), erneut über GoTaq-PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und zur Sequenzierung gesendet. Die Sequenzierung zeigte erneut den erfolgreichen Einbau der mAID-mClover-Resistenzkassette in den *CDK12* Locus (Abb. 4.48).

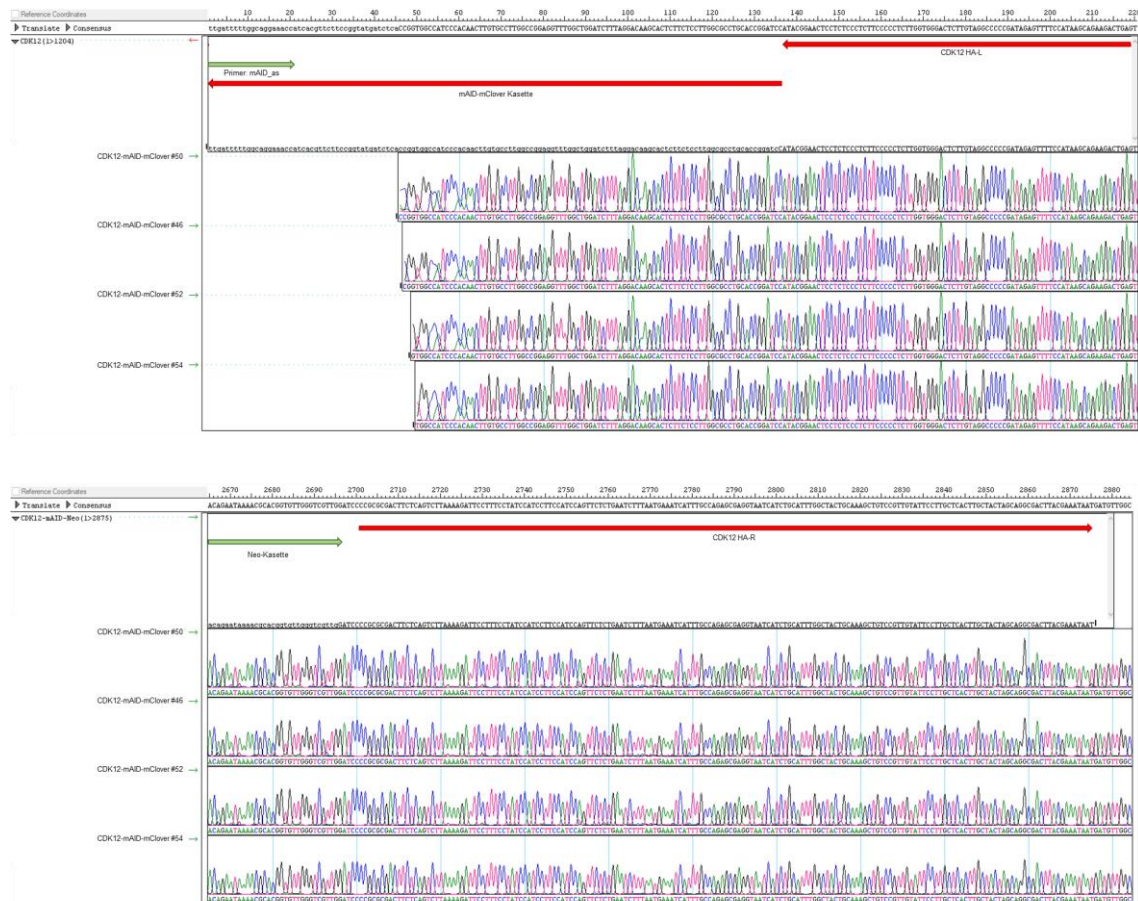


Abb. 4.48 Sequenzierung der genomischen DNA der HCT116 tet-OstIR1 CDK12-mAID-mClover Monokline zur Überprüfung der erfolgreichen Etablierung des Degron Systems.

HCT116 tet-OstIR1 CDK12-mAID-mClover #46, #50, #52 und #54 wurden nach erfolgter Expansion geerntet und die genomische DNA der Zellen wurde isoliert. Über die GoTaq-PCR wurde der Bereich vom endogenen *CDK12* bis zur Sequenz, welche für mAID codiert amplifiziert. Des Weiteren wurde das Amplifikat von dem Sequenzbereich, der für die Neomycin-Resistenz codiert, bis zum endogenen *CDK12* generiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt und zur Sequenzierung gesendet. Für die Sequenzierung wurde zum einen der *antisense* Primer verwendet, welcher die mAID-Sequenz bindet, zum anderen wurde der *sense* Primer verwendet, welcher die Neomycin-Kassette bindet. Die Sequenzierungsergebnisse wurden über DNASTar visualisiert.

Neben der Genotypisierung der Monokline und der damit verbundenen Überprüfung, ob die entsprechenden mAID-(mClover)-Resistenzkassetten erfolgreich in den *CDK12* Locus integriert wurden, sollte auch die Funktionalität des etablierten Degron-Systems getestet werden. Dafür wurden HCT116 tet-OstIR1 WT Zellen und verschiedene HCT116 tet-OstIR1 CDK12-mAID-(mClover) Monokline für 24 h mit Doxycyclin und Auxin behandelt. Doxycyclin sollte dabei die Expression des Auxin-Rezeptors OstIR1 induzieren. Auxin wiederum sollte die Degradation der mAID-fusionierten CDK12 einleiten. Weitere Zellen blieben unbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. Die Western Blot Analyse (Abb. 4.49) zeigte, dass die Doxycyclin-Behandlung die OstIR1-Expression in allen Zelllinien induzierte. In den HCT116 tet-OstIR1 WT Zellen hatte die Auxin-Behandlung keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von CDK12. In allen getesteten Monoklonen nahm die CDK12-Gesamtproteinmenge hingegen durch die Behandlung der Zellen mit Doxycyclin und Auxin ab.

In Monoklonen, in denen CDK12 lediglich mit mAID fusioniert wurde, war die endogene Gesamtproteinmenge von CDK12 verringert. Auch die induzierte Expression von OsTIR1 war in diesen Zellen im Vergleich zu den HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen oder Monoklonen, welche ebenfalls mClover exprimierten, verringert. Der CDK12-Abbau war in diesen Monoklonen weniger deutlich zu erkennen. Aus diesem Grund wurden für weitere Experimente Monoklone verwendet, in denen CDK12 sowohl mit mAID als auch mit dem fluoreszierenden Protein mClover fusioniert wurde. Die Detektion von β -Actin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung.

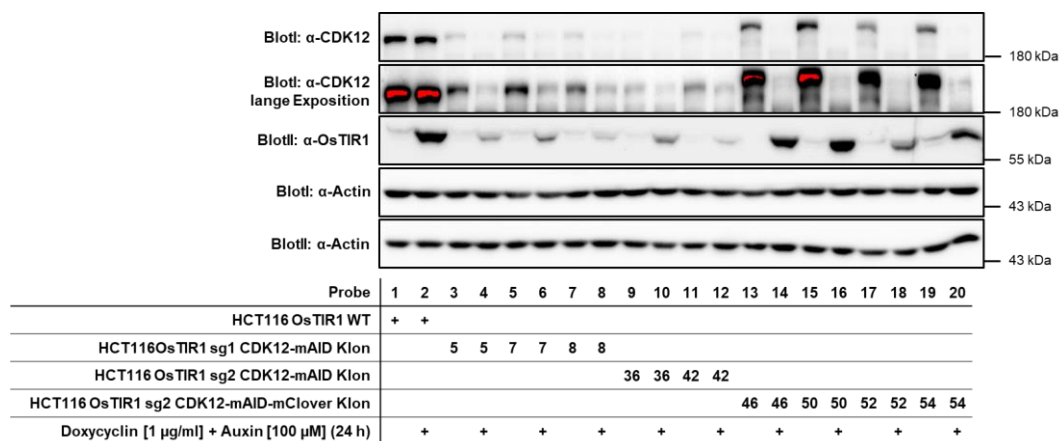


Abb. 4.49 Charakterisierung verschiedener HCT116-tet-OsTIR1 CDK12-mAID-(mClover) Monoklone auf erfolgreiche Degradation von CDK12 nach Auxin-Behandlung.

HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen und verschiedene HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-(mClover) Monoklone wurden für 24 h mit Doxycyclin [1 µg/ml] und Auxin [100 µM] behandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt. Die Zellen wurden anschließend geerntet und lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. Es wurde ein biologisches Replikat durchgeführt.

Da CDK12 in einigen Monoklonen nicht nur mit dem mAID, sondern auch mit dem Fluoreszenzprotein mClover fusioniert wurde, konnte die Auxin-induzierte Degradation von CDK12 auch mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Dafür wurden HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen und HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 für 24 h mit 1 µg/ml Doxycyclin und 250 µM Auxin behandelt. Weitere Zellen wurden mit Doxycyclin und Ethanol behandelt, welches als Lösungsmittelkontrolle des Auxins diente. Zusätzlich blieben Zellen unbehandelt. Die Zellen wurden anschließend mit HBSS gewaschen und in Paraformaldehyd fixiert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen in Mounting Medium eingebettet. Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Mikroskopieaufnahmen zeigten in den HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen nur eine geringe grüne Hintergrundfluoreszenz (Abb. 4.50). Auch die Behandlungen der Zellen hatte keinen Einfluss auf die auftretende Fluoreszenz. In HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 wiesen hingegen alle unbehandelten Zellen eine starke grüne Fluoreszenz auf. Die Detektion von CDK12-mAID-mClover erfolgte dabei überwiegend im Zellkern. Zudem war eine spezifische Lokalisation in nuklearen speckles erkennbar. Durch die Behandlung der Zellen mit Doxycyclin und Ethanol

war die Fluoreszenz leicht verringert. Wurden die Zellen simultan mit Doxycyclin und Auxin behandelt, war nur noch eine geringe grüne Fluoreszenz zu beobachten. Die Fluoreszenz war vergleichbar mit der Hintergrundfluoreszenz der HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen. Die Degradation von CDK12 konnte somit auch in der Mikroskopie nachgewiesen werden. Das Auxin-induzierte Degron System wurde somit erfolgreich etabliert.

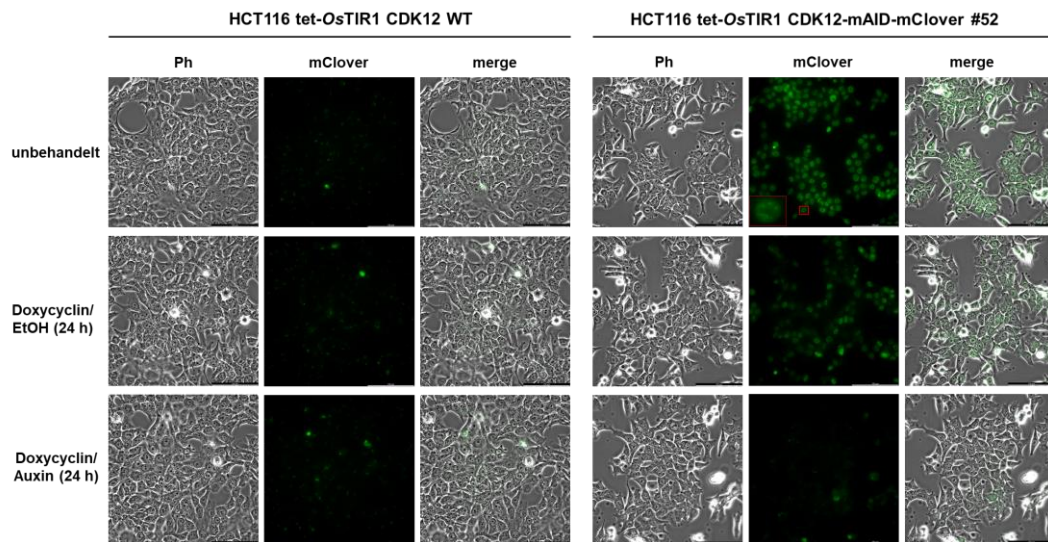


Abb. 4.50 Nachweis der Auxin-induzierten Degradation von CDK12 über die Fluoreszenz von mClover.

HCT116 tet-OsTIR1 WT und HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 wurden für 24 h mit Doxycyclin [1 µg/ml] und Auxin [100 µM] behandelt. Weitere Zellen wurden mit Doxycyclin [1 µg/ml] und Ethanol [0.1 %] behandelt. Zusätzlich blieben Zellen unbehandelt. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und mit Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem Waschen mit HBSS wurden die Zellen in Mounting Medium eingebettet. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie (Vergrößerung: 40x). Es wurde ein biologisches Replikat von Dr. Johanna Meier-Sölch durchgeführt.

Da die Fluoreszenzmikroskopie darauf hindeutete, dass die Doxycyclin-Behandlung des Degron-Monoklons einen Effekt auf die Gesamtproteinmenge von CDK12 hatte, wurde die Auswirkung von Doxycyclin auf die IL-1 induzierte Genexpression untersucht. Dafür wurden HCT116 tet-OsTIR1 WT und HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 für 24 h mit Doxycyclin behandelt. Als Kontrolle blieben weitere Zellen unbehandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 3 h mit IL-1 stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Zellen wurden geerntet und die RNA wurde isoliert. Nach erfolgter reverser Transkription wurde die Genexpression einiger IL-1 Zielgene mittels qPCR bestimmt. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Doxycyclin die IL-1 induzierte Expression von *IL8* und *CXCL2* in beiden Zelllinien verstärkte (Abb. 4.51). Um den Einfluss der Auxin-induzierten CDK12 Degradation auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 vermittelte Genexpression untersuchen zu können, wurden in nachfolgenden Experimenten alle Zellen als Kontrolle mit Doxycyclin behandelt, auch wenn diese nicht mit Auxin behandelt wurden.

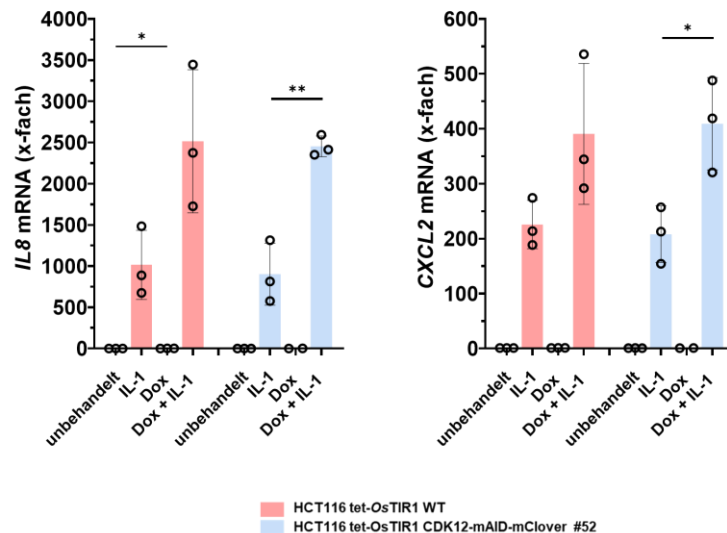


Abb. 4.51 Doxycyclin steigert die basale und induzierte Expression von IL-1 Zielgenen.

HCT116 tet-OsTIR1 Zellen und HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 wurden für 24 h mit Doxycyclin [1 µg/ml] behandelt. Weitere Zellen blieben unbehandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die RNA wurde isoliert. Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR wurden durchgeführt. Es wurden Taqman-Sonden verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen ActB und die unbehandelten HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen. Es sind jeweils die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$)

4.3.2 Einfluss der spezifischen CDK12 Degradation und der simultanen Depletion von CDK12/13 auf den IL-1 Signalweg

Ziel der folgenden Arbeiten war es, den Einfluss der spezifischen Degradation von CDK12 auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 vermittelte Genexpression zu untersuchen. Da CDK12 eine wichtige Rolle in zentralen Prozessen der Genexpression und dadurch auch bei der DNA-Reparatur spielt und ein permanenter Verlust zum Zelltod führt, wurde das etablierte Degron-System verwendet, welches eine schnelle, transiente und reversible Degradation erlaubt (Choi et al., 2020; Lui et al., 2018; Natsume et al., 2016). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der Verlust von CDK12 eventuell durch die homologe Kinase CDK13 kompensiert wird. Dazu sollten CDK12 und CDK13 simultan depletiert werden. Das Auxin-induzierte Degron System erlaubt eine Kombination mit weiteren genetischen Anwendungen. Über *small interfering* RNAs (siRNAs) sollte daher ein *knockdown* von CDK13 simultan zur Auxin-induzierten Degradation von CDK12 herbeigeführt werden. Die sogenannte RNA-Interferenz (RNAi) dient der Abschaltung von Zielgenen mittels sequenz-spezifischer siRNAs. Dabei wird die zur siRNA komplementäre mRNA des Zielgens gespalten und degradiert. Das Gen wird somit posttranskriptionell stummgeschaltet. Für den RNAi-vermittelten *knockdown* von CDK13 wurden vorerst vier verschiedene siRNAs getestet, welche von Qiagen bezogen wurden. HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen wurden mittels HiPerfect mit insgesamt 20 nM siRNA transfiziert. Dabei wurde entweder eine der siRNAs (siCDK13_1, siCDK13_2, siCDK13_3 oder

siCDK13_4) verwendet oder es wurde ein Pool aus allen vier siRNAs, welche gegen CDK13 gerichtet waren, gebildet. Weiterhin wurden Zellen als Transfektionskontrolle mit 20 nM siLuci transfiziert. Hierbei handelt es sich um eine siRNA, welche gegen die Luciferase-mRNA gerichtet ist. Diese wird in humanen Zellen nicht exprimiert. Weitere Zellen wurden lediglich mit den Transfektionsreagenzien ohne siRNA inkubiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen entweder für 6 h oder für 24 h kultiviert. Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel. Das Transfektionsmedium wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut in Tetracyclin-freiem Vollmedium gehalten. Insgesamt 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert und die entsprechenden Lysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. Aus weiteren Zellen wurde die RNA für eine anschließende RT-qPCRs isoliert.

Die Western Blot Analyse (Abb. 4.52 A) zeigte, dass die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsmedium für 6 h keinen Einfluss auf die CDK13 Gesamtproteinmenge hatte. Wurde der Mediumwechsel erst 24 h nach der Transfektion durchgeführt, war die CDK13 Gesamtproteinmenge reduziert, wenn die Zellen mit siCDK13_1, siCDK13_2 oder siCDK13_4 transfiziert wurden. Die Transfektion mit den genannten siRNAs hatte zudem keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von CDK12 im Vergleich zu untransfizierten Zellen oder Zellen, welche mit siLuci transfiziert wurden. Die Transfektion mit siCDK13_3 hatte wiederum keinen Einfluss auf die Proteinmengen von CDK13 und CDK12. Wurden die Zellen mit einem siRNA-Pool aus allen vier siRNAs gerichtet gegen CDK13 (insgesamt 20 nM) transfiziert, war die Gesamtproteinmenge von CDK13 ebenfalls stark reduziert. Jedoch trat auch eine Reduzierung der CDK12-Menge ein. Die Detektion von Actinin diente dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung.

Die Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR (Abb. 4.52 B) zeigte, dass die Transfektion der Zellen mit siLuci keinen Einfluss auf die mRNA Mengen von CDK13 und CDK12 hatte. Wurden die HCT116 tet-OsTIR1 Zellen mit siCDK13_1, siCDK13_2 oder siCDK13_4 transfiziert und wurde das Transfektionsmedium nach 6 h entfernt, war die mRNA Menge von *CDK13* um ca. 40 % reduziert. Wurde das Medium wiederum erst nach 24 h gewechselt, konnte eine Reduzierung der mRNA Menge von *CDK13* um 53-62 % beobachtet werden. Auf die mRNA Menge von *CDK12* hatten die siRNAs nur einen geringen Einfluss. Wurden die Zellen mit der Kombination aus allen vier siRNAs, welche gegen *CDK13* gerichtet waren, transfiziert, war die mRNA Menge von *CDK13* ebenfalls stark reduziert, wenn das Medium nach 24 h gewechselt wurde. Allerdings war auch die mRNA Menge von *CDK12* verringert. Für weiterführende Versuche wurde eine Kombination aus siCDK13_1 und siCDK13_2 verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte stets nach 24 h.

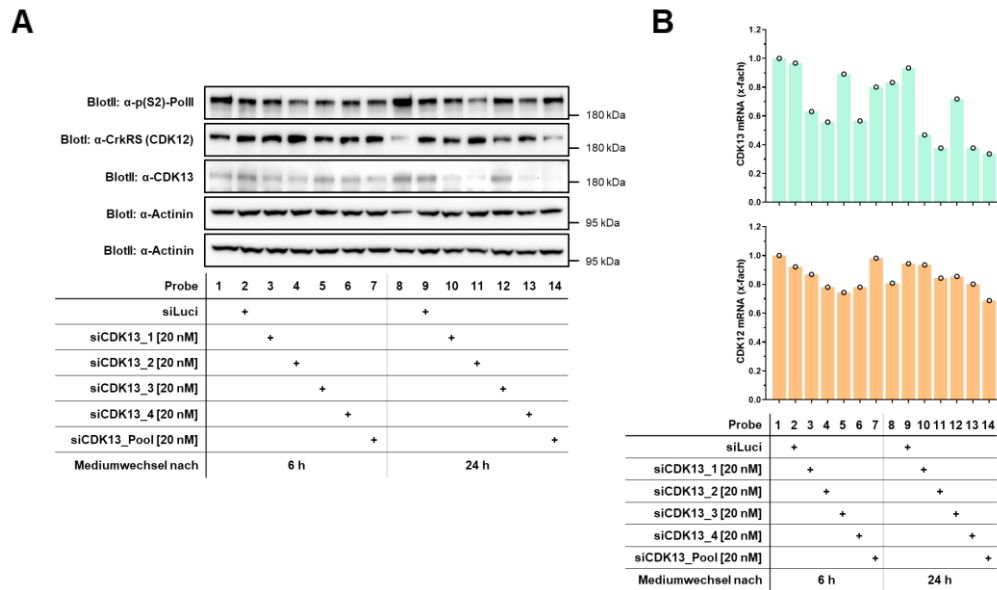


Abb. 4.52 Etablierung des siRNA-vermittelten knockdowns von CDK13.

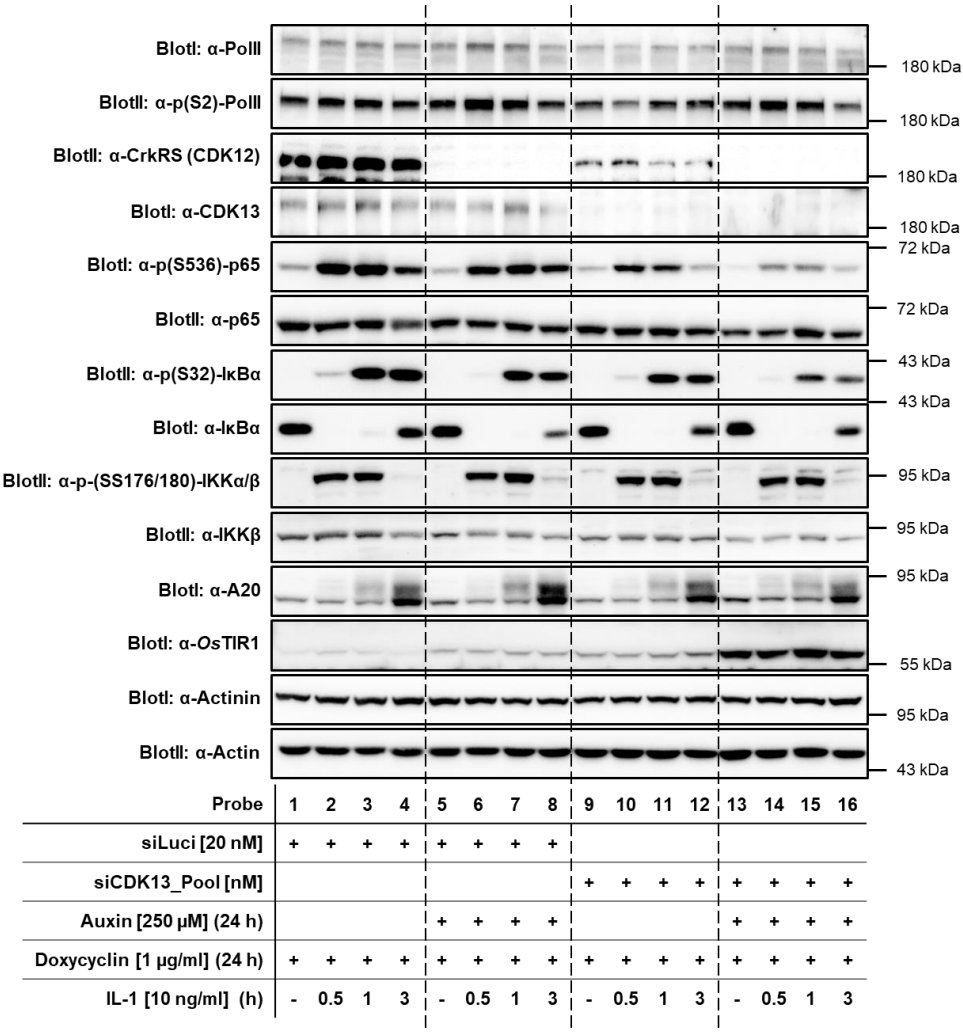
HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen wurden mittels HiPerfect mit siCDK13_1 [20 nM] oder siCDK13_2 [20 nM] oder siCDK13_3 [20 nM] oder siCDK13_4 [20 nM] transfiziert. Weiteren Zellen wurden mit einem Pool aus siCDK13_1, siCDK13_2, siCDK13_3 und siCDK13_4 [insgesamt 20 nM] transfiziert. Zusätzlich wurden Zellen mit siLuci [20 nM] transfiziert oder wurden lediglich mit den Transfektionsreagenzien inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde entweder 6 h oder 24 h nach der Transfektion durch Vollmedium ersetzt. Insgesamt 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. (A) Zellen wurden lysiert und Gesamtzelllysate zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Die RNA der Zellen wurde isoliert. Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR wurden durchgeführt. Es wurden SYBR-Green Assays verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen ActB und die unbehandelten HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen. Es wurde ein biologisches Replikat durchgeführt.

Um den Einfluss der Auxin-induzierten CDK12 Degradation, des siRNA-vermittelten *knockdowns* von CDK13 und der simultanen Depletion von CDK12 und CDK13 auf den IL-1 Signalweg zu untersuchen, wurden HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 mit einer Kombination aus siCDK13_1 und siCDK13_2 transfiziert. Weitere Zellen wurden als Transfektionskontrolle mit siLuci transfiziert oder wurden lediglich mit den Transfektionsreagenzien inkubiert. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch Tetracyclin-freies Vollmedium ersetzt. Alle Zellen wurden daraufhin für 24 h mit Doxycyclin behandelt, um die Expression von OsTIR1 zu induzieren. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen für 24 h mit Auxin behandelt. Weitere Zellen wurden zur Lösungsmittelkontrolle mit Ethanol behandelt. Zusätzlich wurden die Monoklone für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 stimuliert oder blieben unstimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert und die Lysate wurden zur Detektion von Proteinen im Western Blot eingesetzt. Zudem wurde aus dem anderen Teil der Zellen die RNA isoliert. Anschließend wurden Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR durchgeführt.

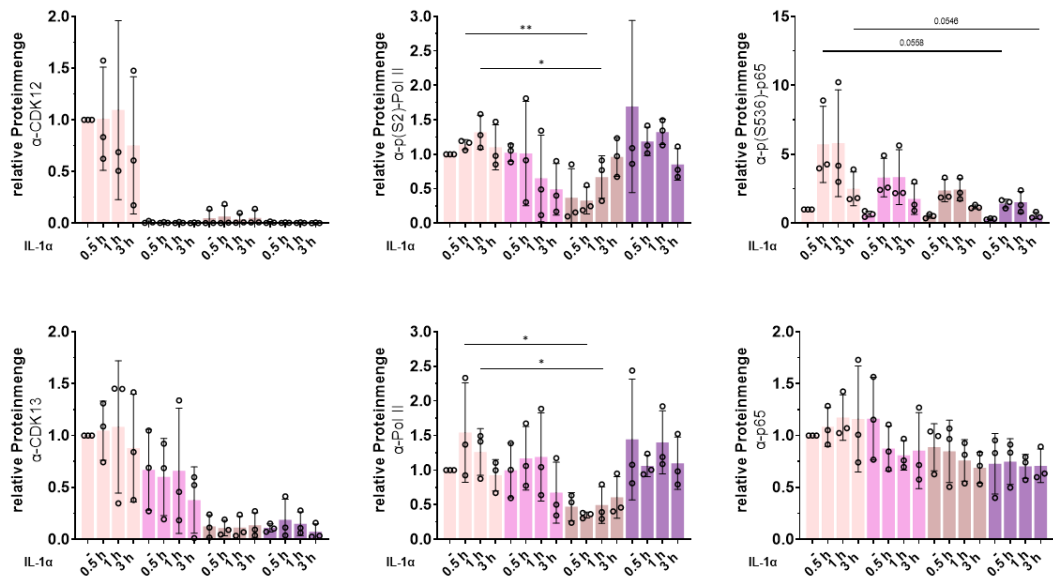
Die Western Blot Analyse (Abb. 4.53) zeigte, dass die Transfektion der Zellen mit siCDK13 zu einer reduzierten Gesamtproteinmenge von CDK13 führte. Auch die Gesamtproteinmenge von CDK12 war in Folge der Transfektion verringert. Allerdings könnte dies auf technische

Probleme beim Blotten zurückzuführen sein, da die Detektion großer Proteine generell herausfordernd ist und während der Arbeit hierbei immer wieder Probleme auftauchten. Wurden die Zellen mit Auxin behandelt, wurde CDK12 vollständig degradiert. Auf die Proteinmenge von CDK13 hatte die Auxin-Behandlung keinen Einfluss. Sowohl der alleinige *knockdown* von CDK12 als auch die simultanen Depletion der beiden Kinasen, hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von (S2)-Pol II oder die Gesamtproteinmenge von Pol II. Die alleinige Depletion von CDK13 führte zu einer verringerten Phosphorylierung von Pol II und auch die Gesamtproteinmenge war reduziert. Wurde CDK12 durch die Auxin-Behandlung der Zellen degradiert, war die IL-1 induzierte Phosphorylierung von p65 im Vergleich zu Ethanol behandelten Zellen, welche mit siLuci transfiziert wurden, minimal verringert. Auch der *knockdown* von CDK13 mittels RNA-Interferenz sorgte für eine Reduktion der IL-1 vermittelten p65-Phosphorylierung. Wurden wiederum die beiden Kinasen CDK12/13 parallel depletiert, so wurde der beschriebene Effekt verstärkt. Die Phosphorylierung von p65 war zu jedem Zeitpunkt der Stimulation im Vergleich zu Zellen, welche mit siLuci transfiziert und mit Ethanol behandelt wurden, reduziert. Allerdings handelte es sich hierbei nur um sehr schwache Effekte, welche nicht signifikant waren. Die Gesamtproteinmenge von p65 wurde ebenfalls lediglich schwach und nicht signifikant beeinflusst. Des Weiteren war die IL-1 induzierte Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ leicht reduziert, wenn die Proteinmenge einer der beiden CDKs reduziert wurde. Die gemeinsame Depletion sorgte dabei nicht für eine Verstärkung des Effekts. Auch hier konnten keine signifikanten Effekte dargestellt werden. Die Gesamtproteinmenge von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Auch auf den IL-1 induzierten proteasomalen Abbau oder die Re-Synthese von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ hatte der CDK12/13 *knockdown* keinen Einfluss. Die Analyse zeigte zudem, dass die IL-1 vermittelte Phosphorylierung von IKK β durch die Auxin-induzierte Degradation von CDK12 nicht beeinflusst wurde. Wurden die Zellen hingegen mit siRNAs, welche gegen CDK13 gerichtet waren, transfiziert, war die IL-1 induzierte Phosphorylierung von IKK β zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zu Zellen, welche mit siLuci transfiziert wurden, verringert. Wurden CDK12 und CDK13 simultan depletiert, wurde dieser Effekt verstärkt. Auch hierbei handelte es sich insgesamt um schwache Effekte, welche keine Signifikanz aufwiesen. Der CDK *knockdown* hatte keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von IKK β . Auch auf die IL-1 induzierte Synthese von A20 hatte die Auxin-Behandlung und die Transfektion der Zellen mit siCDK13 keinen Effekt. In allen Proben konnte OstIR1 detektiert werden, da alle Zellen zuvor mit Doxycyclin behandelt worden waren. Wurden die Zellen allerdings sowohl mit siCDK13 transfiziert als auch mit Auxin behandelt, so wurde die Expression von OstIR1 verstärkt. Die Detektion der Proteine β -Actin und Actinin diente dem Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung. Für die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 4.53 B) wurden die Intensitäten der Chemilumineszenz bestimmt.

A



B



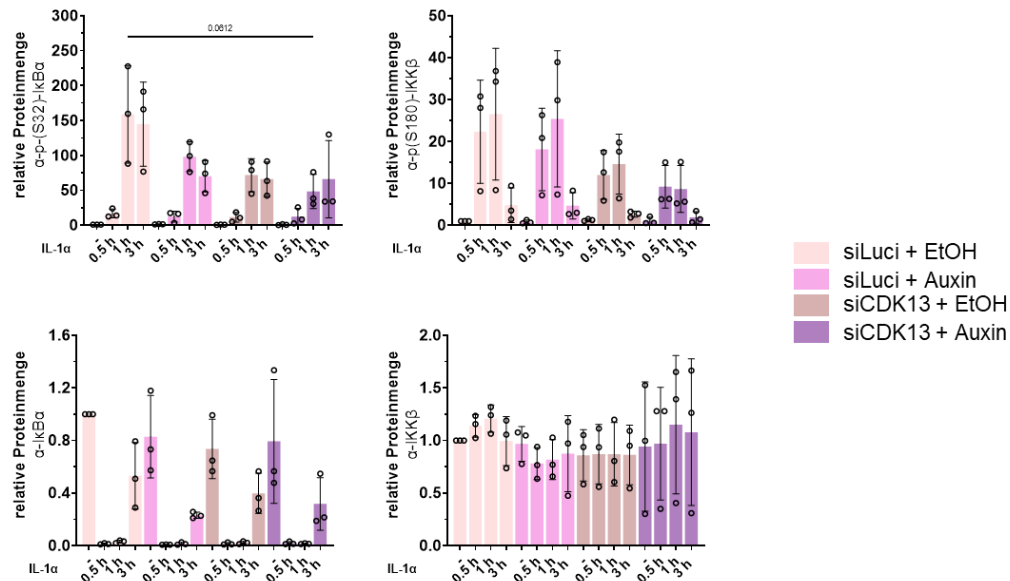


Abb. 4.53 Moderater Einfluss der spezifischen CDK12 Degradation und der simultanen Depletion von CDK12/13 auf den IL-1 Signalweg.

HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 wurden mittels HiPerfect mit einer Kombination aus siCDK13_1 und siCDK13_2 [20 nM] transfiziert. Weitere Zellen wurden als Transfektionskontrolle mit siLuci [20 nM] transfiziert. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. Alle Zellen wurden für 24 h mit Doxycyclin [1 µg/ml] behandelt. Weiterhin wurden Zellen mit Auxin [250 µM] oder als Lösungsmittelkontrolle mit EtOH [0.01 %] behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert oder Zellen blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. (A) Die Gesamtzelllysate wurden zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse. Die Chemilumineszenz-Intensitäten wurden auf die Probe normalisiert, welche mit siLuci transfiziert und mit EtOH behandelt wurde. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind jeweils die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt.

Die Genexpressionsanalysen (Abb. 4.54) deuteten darauf hin, dass die Transfektion der HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 mit siLuci keinen Einfluss auf die IL-1 induzierte Genexpression im Vergleich zu Zellen, welche lediglich mit den Transfektionsreagenzien inkubiert wurden, hatte. Zudem zeigte die Analyse, dass die Auxin-Behandlung der Zellen und die damit verbundene Degradation von CDK12 keinen Einfluss auf die IL-1 vermittelte Genexpression von *IL8*, *CXCL2*, *NFKBIA* oder *ICAM1* hatte. Auch die Transfektion der Zellen mit siRNAs, welche spezifisch gegen CDK13 gerichtet waren, beeinflusste die Expression der getesteten IL-1 Zielgene nicht. Wurden CDK12 und CDK13 wiederum simultan depletiert, war die IL-1 induzierte Expression von *NFKBIA* nach 1 h und nach 3 h IL-1 Stimulation im Vergleich zu untransfizierten Zellen, welche mit Ethanol behandelt wurden, signifikant verringert. Auch die mRNA Menge von *IL8* und *CXCL2* war nach 1 h IL-1 Stimulation reduziert, wenn die Zellen simultan mit siCDK13 transfiziert und mit Auxin behandelt wurden. Es handelte sich hierbei allerdings nicht um signifikante Effekte. Die IL-1 induzierte Expression von *ICAM1* wurde zu keinem Zeitpunkt durch die zeitgleiche Depletion von CDK12 und CDK13 beeinflusst. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass die Auxin-Behandlung der Zellen, welche mit siCDK13 transfiziert wurden, zu einer verstärkten Reduzierung der mRNA Menge von *CDK13* führte. Auch die Expression von *CDK12* war verringert, wenn die Zellen mit siCDK13 transfiziert und mit Auxin behandelt wurden.

Insgesamt wurde gezeigt, dass der *knockdown* von CDK12 und CDK13 keinen großen Einfluss auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 vermittelte Genexpression hatte. Die simultane Depletion von CDK12/13 verstärkte auftretende Effekte, welche aber überwiegend nicht signifikant waren. Diese genetischen *loss-of-function* Ansätze zeigten im Gegensatz zu den Kinasehemmstoffen und dem PROTAC, dass der IL-1-induzierbare Genexpressionsweg, zumindest in Bezug auf die hier erfassten Parameter, offenbar weitgehend unabhängig von zwei der wichtigsten transkriptionellen CDKs reguliert werden kann. Eine Frage, die sich daraus ergibt ist, ob der spezifische Verlust von CDK12/13 durch weitere transkriptionelle CDKs kompensiert wird, oder ob die IL-1 Zielgene besondere Eigenschaften aufweisen (z.B. nur wenige Exons / Introns und „kurze“ Genkassetten, regulierbare mRNA Stabilitäten), welche eine relative „Resistenz“ gegen eine Perturbation von CDK12/13 ermöglichen.

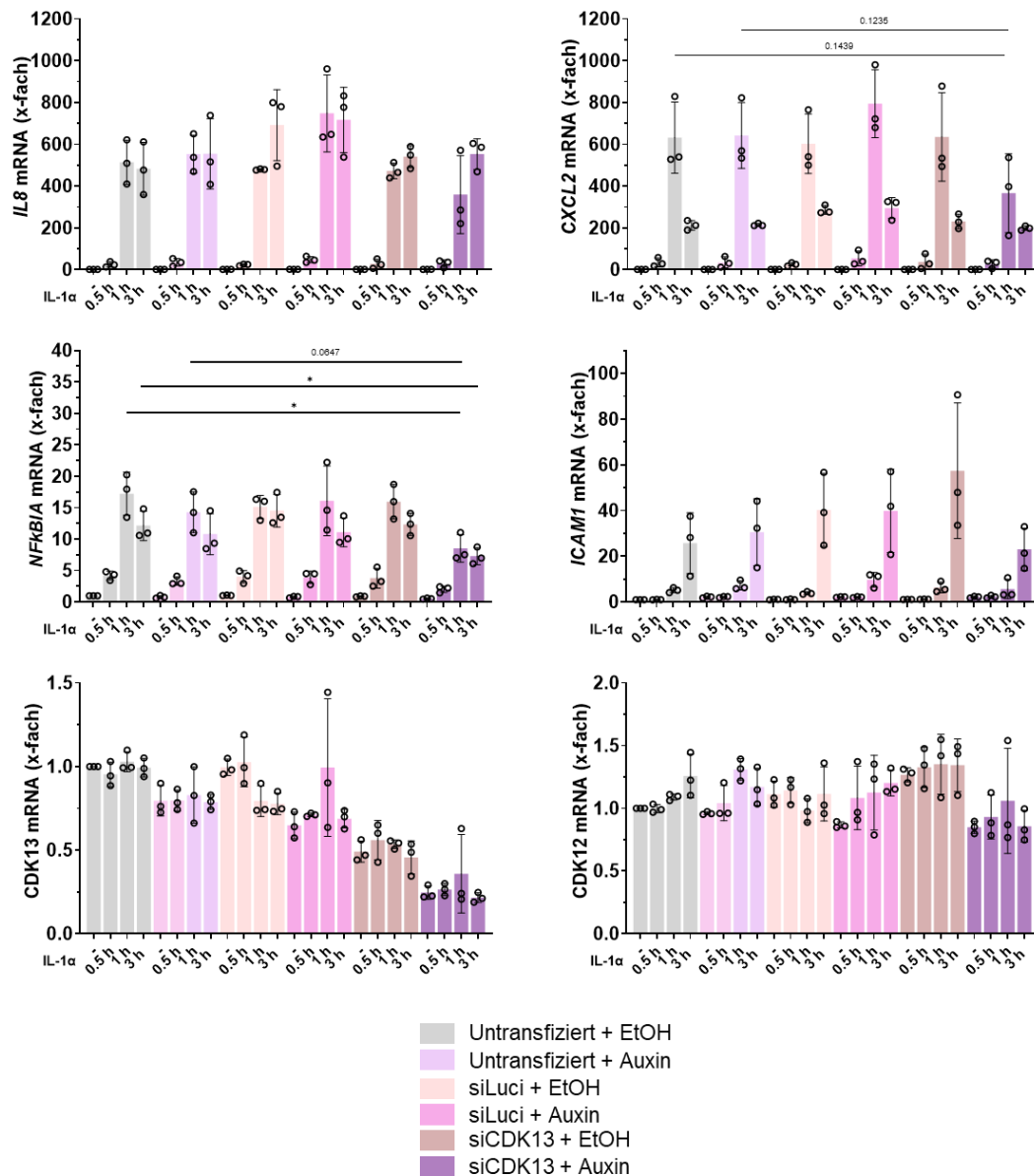


Abb. 4.54 Moderater Einfluss der spezifischen CDK12 Degradation und der simultanen Depletion von CDK12/13 auf die IL-1 vermittelte Genexpression.

HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover #52 wurden mittels HiPerfect mit einer Kombination aus siCDK13_1 und siCDK13_2 [20 nM] transfiziert. Weitere Zellen wurden als Transfektionskontrolle mit siLuci [20 nM] transfiziert während weitere Zellen lediglich mit den Transfektionsreagenzien inkubiert wurden. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. Alle Zellen wurden für 24 h mit Doxycyclin [1 µg/ml] behandelt. Weiterhin wurden Zellen mit Auxin [250 µM] oder als Lösungsmittelkontrolle mit EtOH [0.01 %] behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 0.5 h, 1 h oder 3 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert oder blieben unstimuliert. Die RNA der Zellen wurde isoliert. Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR wurden durchgeführt. Es wurden Taqman-Sonden (*IL8*, *CXCL2*, *ICAM1*, *NFKBIA*, *ActB*) oder SYBR-Green Assays (*CDK12*, *CDK13*, *ActB*) verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen *ActB* und die untransfizierten, mit EtOH behandelten Zellen. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei biologischen Replikaten dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein ungepaarter, parametrischer und zweiseitiger T-Test durchgeführt (* $p \leq 0.05$).

4.4 Identifizierung des naszierenden Sekretoms mittels L-HPG Markierung und KCLICK Chemie

Neben der Charakterisierung der Funktion von CDKs im IL-1-NF- κ B System war ein zweites Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu entwickeln, welche es erlaubte, das Sekretom bzw. die Proteine im Zellkulturüberstand unvoreingenommen zu analysieren. Verwendet wurde hierfür eine Methode, welche auf der metabolischen Markierung der Zellen mit L-Homopropargylglycin (L-HPG) und der sogenannten KCLICK Chemie basierte. Dies wurde mit hochauflösender Massenspektrometrie kombiniert.

Bei L-HPG handelt es sich um ein Aminosäure-Analogon, welches eine Alkin-Gruppe besitzt. Unter Verwendung von Methionin-freiem Medium wird L-HPG während der Translation anstelle von Methionin in die naszierenden Proteine eingebaut. Somit werden neu-gebildete Proteine mit L-HPG und dessen Alkin-Gruppe markiert. Aufgrund der Alkin-Gruppe kann L-HPG über eine sogenannte KCLICK Reaktion mit einem Biosensor konjugiert werden, welcher eine Azid-Gruppe enthält. In dieser Arbeit wurde hierfür das Biotin-Azid verwendet. Bei der KCLICK Reaktion handelt es sich um eine Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. Nach Durchführung dieser KCLICK Reaktion sind somit alle neu-synthetisierten Proteine an Biotin gekoppelt. Über Streptavidin können die Biotin-markierten Proteine aufgereinigt und im Western Blot oder in der Massenspektrometrie analysiert werden (Abb. 4.55). Vorteil des L-HPGs ist es, dass weiterhin vollständige und funktionsfähige Proteine gebildet werden. Das Alkin-gekoppelte Puromycinanalogon O-Propargylpuromycin (OPP) erlaubt zwar ebenfalls eine sehr effektive metabolische Markierung von neu-synthetisierten Polypeptiden, sorgt aber durch einen sofortigen Abbruch der Translation für eine unvollständige Synthese der meisten Proteine (Abb. 8.9). Dies hat einen starken Einfluss auf die Zellviabilität (Abb. 8.10). Erste Überlegungen ließen darauf schließen, dass die frühzeitige Termination die Sekretion der Proteine verhindern könnte, weshalb für die Analyse des Sekretoms L-HPG anstelle des OPPs gewählt wurde.

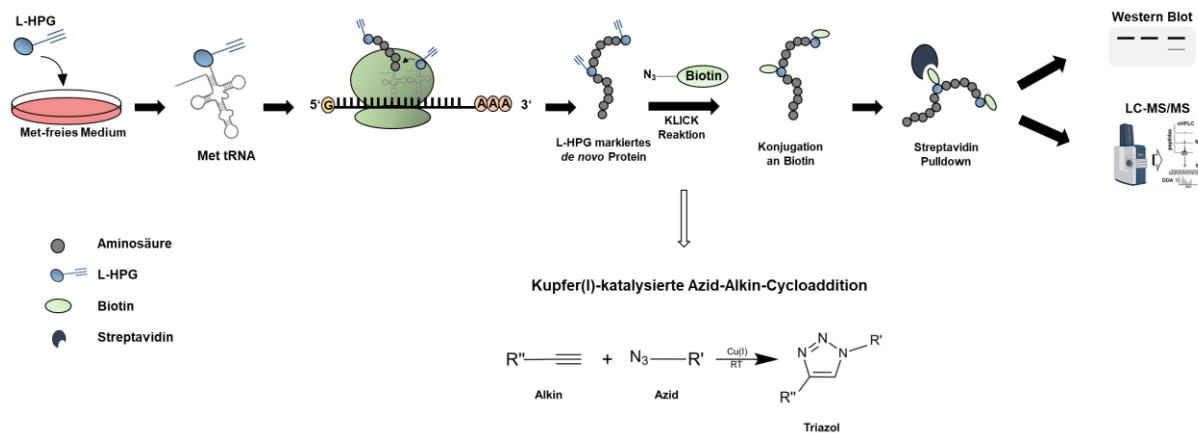


Abb. 4.55 Prinzip der metabolischen Markierung mittels L-HPG gefolgt von KLICK Chemie und LC-MS/MS zur Analyse naszierender Proteome.

Epithelzellen werden für die Zeit der Markierung in Methionin-freiem Medium kultiviert. L-Homopropargylglycin (L-HPG) wird dem Medium beigesetzt. Es handelt sich hierbei um ein Methionin-Analogon, welches anstelle von L-Methionin in neu-synthetisierte Proteine eingebaut wird. Aufgrund der Alkin-Gruppe des L-HPGs kann dieses über eine sogenannte KLICK Reaktion mit Biotin-Azid konjugiert werden. Es handelt sich hierbei um eine durch Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. Naszierende Proteine werden somit mit Biotin versehen. Dies erlaubt die Aufreinigung über einen Streptavidin-Beads und die Analyse mittels Immunoblots oder Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

4.4.1 Etablierung der L-HPG Markierung und Aufreinigung von naszierenden Proteinen aus Zellextrakten

Die Etablierung der L-HPG Markierung von neu-synthetisierten Proteinen gefolgt von KLICK Chemie und LC-MS/MS basiert auf den Arbeiten von Forester et al., 2018 (Forester et al., 2018). In einem vorläufigen Experiment wurde der Fokus vorerst auf die intrazellulären und neu-synthetisierten Proteine gelegt, um die Funktionalität der L-HPG-Markierung auszutesten. HCT116 Zellen wurden dreimal mit warmem DPBS gewaschen, um restliches Methionin von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Methionin-freiem Medium kultiviert. Einige Zellen wurden für 3 h mit Cycloheximid behandelt. Hierbei handelt es sich um ein Antibiotikum, welches die Translation hemmt (Schneider-Poetsch et al., 2010). Diese Bedingung diente als wichtige Negativkontrolle. Weitere Zellen wurden für 3 h mit IL-1 stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden für die letzten 2 h der Behandlungen zusätzlich mit L-HPG behandelt, um einen Einbau in die neu-synthetisierten Proteine zu ermöglichen. Als weitere Kontrolle wurden zusätzlich Zellen weiterhin in Vollmedium kultiviert und gänzlich unbehandelt belassen. Nach der Ernte und Lyse der Zellen erfolgte mittels Streptavidin-Beads ein sogenanntes *PreClearing*, um endogen biotinylierte Proteine aus den Lysaten zu entfernen. Anschließend wurde die KLICK Reaktion durchgeführt, um HPG-markierte Proteine über eine Cycloaddition an Biotin zu koppeln. Nach einer Aceton-Fällung und der Aufreinigung mittels Entsalzungs-Säulen, welche der Umpufferung und zur Entfernung der KLICK Reagenzien diente, wurde der Streptavidin-Pulldown durchgeführt, um biotinylierte Proteine anzureichern und aufzureinigen. Im Anschluss wurde die Funktionalität der Methode im Western Blot überprüft, wobei die Signale von Proben vor der KLICK Reaktion und nach der KLICK Reaktion miteinander verglichen wurden. Zusätzlich wurden die Proben nach

Durchführung des Pulldowns untersucht. Um eine Aussage über neu-synthetisierte und biotinylierte Proteine treffen zu können, wurde der Western Blot mittels Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP) hybridisiert. Streptavidin bindet spezifisch an Biotin und somit an alle neu-synthetisierten Proteine, welche über die KLICK Reaktion an Biotin gekoppelt wurden. Über die Chemilumineszenz können die biotinylierten Proteine visualisiert werden. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abb. 4.56) zeigten, dass in den Zelllysaten *per se* keine biotinylierten Proteine über Streptavidin-HRP detektierbar waren. Zwei weitere Negativkontrollen demonstrierten die Spezifität dieses Ansatzes: (i) Nach Durchführung der KLICK Reaktion wurden in der Probe, welche nicht mit L-HPG behandelt wurde, keine neu-synthetisierten Proteine detektiert. (ii) Nach vorheriger Hemmung der Translation mittels Cycloheximid und L-HPG Markierung, wurden ebenfalls keine neu-gebildeten Peptide detektiert. Wurden die Zellen allerdings nur mit L-HPG markiert, waren multiple naszierende Proteinbanden mittels Streptavidin-HRP detektierbar. Dabei konnten Proteine mit jeglicher Größe zwischen 10 kDa und 200 kDa visualisiert werden. Die Gesamtproteinmenge von I κ B α und Actin unterschied sich zwischen den verschiedenen Proben und den Lysaten und KLICK Lysaten nicht. In den KLICK Lysaten waren die nicht-biotinylierten Proteine weiterhin enthalten. Erst durch die Durchführung des Pulldowns mittels Streptavidin-Beads wurden die neu-synthetisierten Peptide aufgereinigt und nicht-biotinylierte Proteine entfernt (Abb. 4.56). Wie erwartet wurden nach Durchführung des Pulldowns in den Proben, welche nicht mit L-HPG behandelt wurden oder vorab mit Cycloheximid behandelt wurden, keine neu-gebildeten Proteine detektiert. Dies traf auch für I κ B α zu, welches nach der IL-1 vermittelten schnellen Degradation innerhalb von 1-3 h neu synthetisiert wird, um das Ausgangsproteinlevel wieder zu erreichen. Wurden die Zellen mit L-HPG markiert, konnten neu-synthetisierte Proteine über Streptavidin-HRP detektiert werden, inklusive des IL-1 abhängig neu gebildeten Anteils von I κ B α , welches über einen spezifischen I κ B α -Antikörper detektiert wurde. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-1 stimuliert, war die Menge an neu-synthetisierten I κ B α erhöht. Die Ergebnisse zeigten somit, dass die Markierung und Aufreinigung von neu-synthetisierten Proteinen mittels des Methionin-Analogons L-HPG in Zelllysaten global und für spezifische Proteine wie I κ B α sehr gut funktionierte.

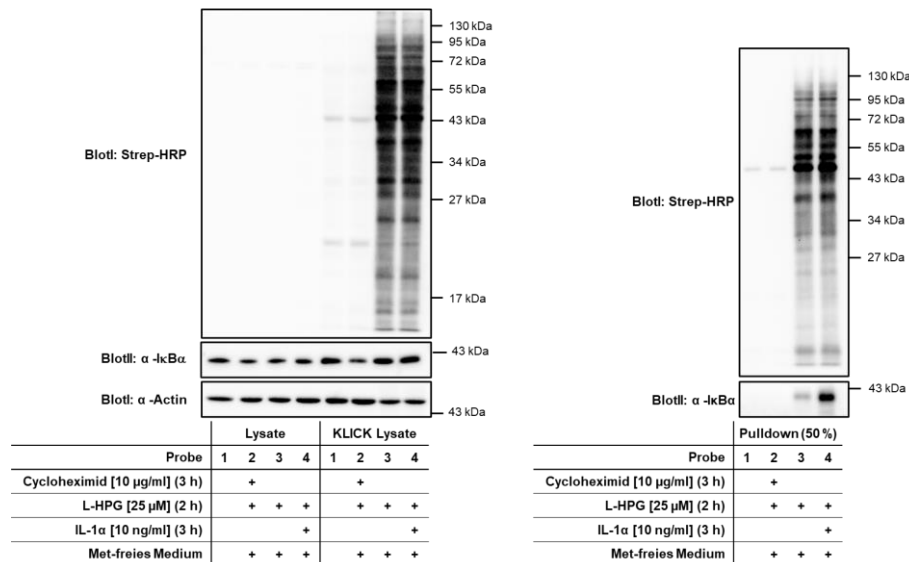


Abb. 4.56 Metabolische Markierung von neu-synthetisierten Proteinen in HCT116 Zellen mittels L-Homopropargylglycin (L-HPG).

HCT116 Zellen wurden in Methionin-freiem Medium kultiviert. Einige Zellen wurden für insgesamt 3 h mit Cycloheximid [10 µg/ml] behandelt. Andere Zellen wurden für 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen für 2 h mit L-HPG behandelt. Weitere Zellen wurden weiterhin in Vollmedium kultiviert und blieben gänzlich unbehandelt. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Es wurde ein *PreClearing* durchgeführt. Anschließend wurden L-HPG markierte Proteine mittels KLICK Reaktion biotinyliert. Nach einer Aceton-Fällung und verschiedenen Aufreinigungsschritten wurde ein Pulldown mittels Streptavidin-Beads durchgeführt, um biotinylierte Proteine aufzureinigen. Die Proben der einzelnen Zwischenschritte wurden mittels Western Blot analysiert. Die biotinylierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert.

4.4.2 Etablierung der L-HPG Markierung und Aufreinigung von naszierenden Proteinen aus Zellkulturüberständen zur Analyse des naszierenden Sekretoms

Da die Markierung von neu-synthetisierten Proteinen mittels L-HPG und KLICK Chemie in den Lysaten der Zellen erfolgreich war, wurde untersucht, ob auch die Detektion von neu-synthetisierten und sekretierten Proteinen möglich war. Hierfür wurde die KLICK Reaktion mit den Zellkulturüberständen der Zellen durchgeführt. Bei Sekretom-Analysen ist häufig das Serum im Zellkulturmedium ein limitierender Faktor, welcher die Detektion von Proteinen beeinträchtigt oder sogar komplett maskiert. Aus diesem Grund wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und schließlich in Methionin-freiem Medium kultiviert, welches 1 % FBS enthält. Parallel zum vorangegangenen Experiment der Lysate wurden die Zellen für 3 h mit Cycloheximid oder IL-1 vorbehandelt. In den letzten 2 h der Behandlungen wurden die neu-synthetisierten Proteine mit L-HPG markiert. Nach der Ernte wurde 1 ml des Zellkulturüberstands für das *PreClearing* eingesetzt. Des Weiteren wurde eine reine Mediumkontrolle, welche 1 % FBS enthielt, mitgeführt. Nach dem *PreClearing* wurde die KLICK Reaktion wie gewohnt durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend gefällt, aufgereinigt und mittels Western Blot analysiert. Die Analyse (Abb. 4.57 A) zeigte, dass in jeder Probe Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 55-70 kDa mittels Streptavidin-HRP detektiert wurden. Auch in Proben, welche nicht mit L-HPG behandelt wurden, traten diese Signale auf. Sogar in der Medium-Kontrolle, welche nicht in Kontakt mit Zellen war, wurden diese Peptide visualisiert. Die Coomassie Färbung des Blots zeigte zudem eine gleichmäßige

Proteinverteilung für alle Proben. Auch hierbei fielen vor allem Proteine bei 70 kDa auf. Dies ließ vermuten, dass die 1 % FBS bzw. das darin enthaltene Serumalbumin (66 kDa) die KLICK Reaktion stören könnte oder dass die Menge an Albumin die anderen Proteine überdeckte. Das Experiment wurde erneut mit 0 % FBS im Medium durchgeführt. Zudem wurden direkt 5 ml des Zellkulturüberstands eingesetzt. Der Überstand wurde dabei zunächst über eine Aceton-Fällung präzipitiert. Nach dem *PreClearing* wurde die KLICK Reaktion durchgeführt. Schließlich wurden die Proben aufgereinigt und im Western Blot analysiert. Die Western Blot Analyse (Abb. 4.57 B) zeigte allerdings, dass keine Proteine mehr detektierbar waren. Auch in der Coomassie Färbung konnten keine Proteine angefärbt werden.

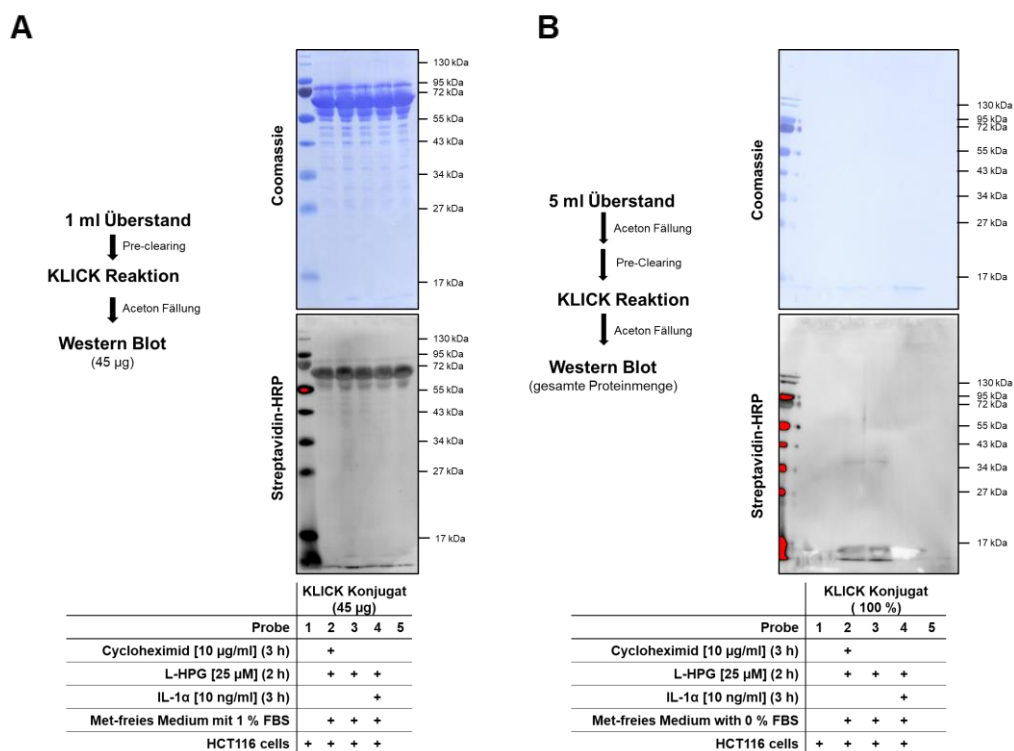


Abb. 4.57 Etablierung der L-HPG Markierung und KLICK Chemie für Zellkulturüberstände zur Analyse des naszierenden Sekretoms.

(A) HCT116 Zellen wurden in Methionin-freiem Medium mit 1 % FBS kultiviert. Einige Zellen wurden für insgesamt 3 h mit Cycloheximid [10 µg/ml] behandelt. Andere Zellen wurden für 3 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen für 2 h mit L-HPG behandelt. Weitere Zellen wurden weiterhin in Vollmedium (mit 1 % FBS) kultiviert und blieben gänzlich unbehandelt. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet. 1 ml des Überstands wurde für das *PreClearing* eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Mediumkontrolle (1 % FBS) mitgeführt. Anschließend wurden L-HPG markierte Proteine mittels KLICK Reaktion biotinyliert. Nach einer Aceton-Fällung und verschiedenen Aufreinigungsschritten wurden die Proben im Western Blot analysiert. Die biotinylierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert. (B) HCT116 Zellen wurden in Methionin-freiem Medium ohne FBS kultiviert. Einige Zellen wurden für insgesamt 3 h mit Cycloheximid [10 µg/ml] behandelt. Andere Zellen wurden für 3 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen für 2 h mit L-HPG behandelt. Weitere Zellen wurden weiterhin in Vollmedium (ohne FBS) kultiviert und blieben gänzlich unbehandelt. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet. 5 ml des Überstands wurden über eine Aceton-Fällung präzipitiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Ein *PreClearing* wurde durchgeführt. Anschließend wurden L-HPG markierte Proteine mittels KLICK Reaktion biotinyliert. Nach einer Aceton-Fällung und verschiedenen Aufreinigungsschritten wurden die Proben im Western Blot analysiert. Die biotinylierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert.

Da im Western Blot keine (neu-synthetisierten) Proteine aus den Zellkulturüberständen detektierbar waren, sollte überprüft werden, ob Aceton für die Fällung der Proteine aus dem Zellkulturüberstand geeignet war. HCT116 Zellen wurden für 3 h mit IL-1 stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände und die Zellen wurden geerntet. Die Zellen wurden lysiert und 25 µg der Lysate als Kontrolle im Western Blot eingesetzt. Zusätzlich wurden 5 ml der Zellkulturüberstände mittels Aceton präzipitiert. Das Pellet wurde direkt in SDS-Ladepuffer resuspendiert. Die Coomassie-Färbung des Western Blots (Abb. 4.58 A) zeigte, dass Proteine aus den Zellkulturüberständen gefällt wurden. Im Vergleich zu 25 µg Lysaten war die Menge an Proteinen allerdings gering. Da diese Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die Fällung prinzipiell funktionierte, sollte getestet werden, welcher Schritt des Protokolls zu dem sichtbaren Verlust an Proteinen führte. Daher wurden HCT116 Zellen für 5 h in Methionin-freiem Medium ohne FBS kultiviert. Während dieser 5 h wurden die Zellen mit L-HPG metabolisch markiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände geerntet und vollständig (10 ml) mittels Aceton gefällt. Das Protokoll wurde schließlich in seine einzelnen Schritte zerlegt und nach jedem Schritt (Fällung, *PreClearing*, KLINK Reaktion, Aufreinigung) wurde eine der Proben für die Western Blot Analyse vorbereitet. Die Vorgehensweise des Experiments ist in Abb. 4.58 gezeigt. Die Coomassie-Färbung des Western Blots (Abb. 4.58 C) zeigte, dass Proteine aus den Zellkulturüberständen präzipitiert werden konnten (Probe 1). Wurde allerdings das *PreClearing* durchgeführt (Probe 2 und 3), war die Proteinmenge stark verringert. Die Aufreinigung über die Entsalzungs-Säulen führte wiederum zu einem vollständigen Verlust der übrigen Proteine (Probe 4). Die Detektion von biotinylierten Proteinen mittels Streptavidin-HRP zeigte, dass nach Durchführung der KLINK Reaktion neu-synthetisierte Proteine detektierbar waren (Probe 3). Wurden die Proben allerdings über die Säulen aufgereinigt, konnten keine biotinylierten Proteine detektiert werden. Dies ließ darauf schließen, dass die Aufreinigung über die Entsalzungs-Säulen zu einem Verlust der Proteine geführt hatte. Bereits das *PreClearing* sorgte für einen hohen Verlust an Proteinen, jedoch waren danach noch neu-gebildete und sekretierte Proteine detektierbar. Für weitere Experimente wurde der Entsalzungsschritt daher weggelassen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Detektion von neu-synthetisierten Proteinen auch in Zellkulturüberständen möglich war. Diese Methode erlaubte die Analyse des naszierenden Sekretoms.

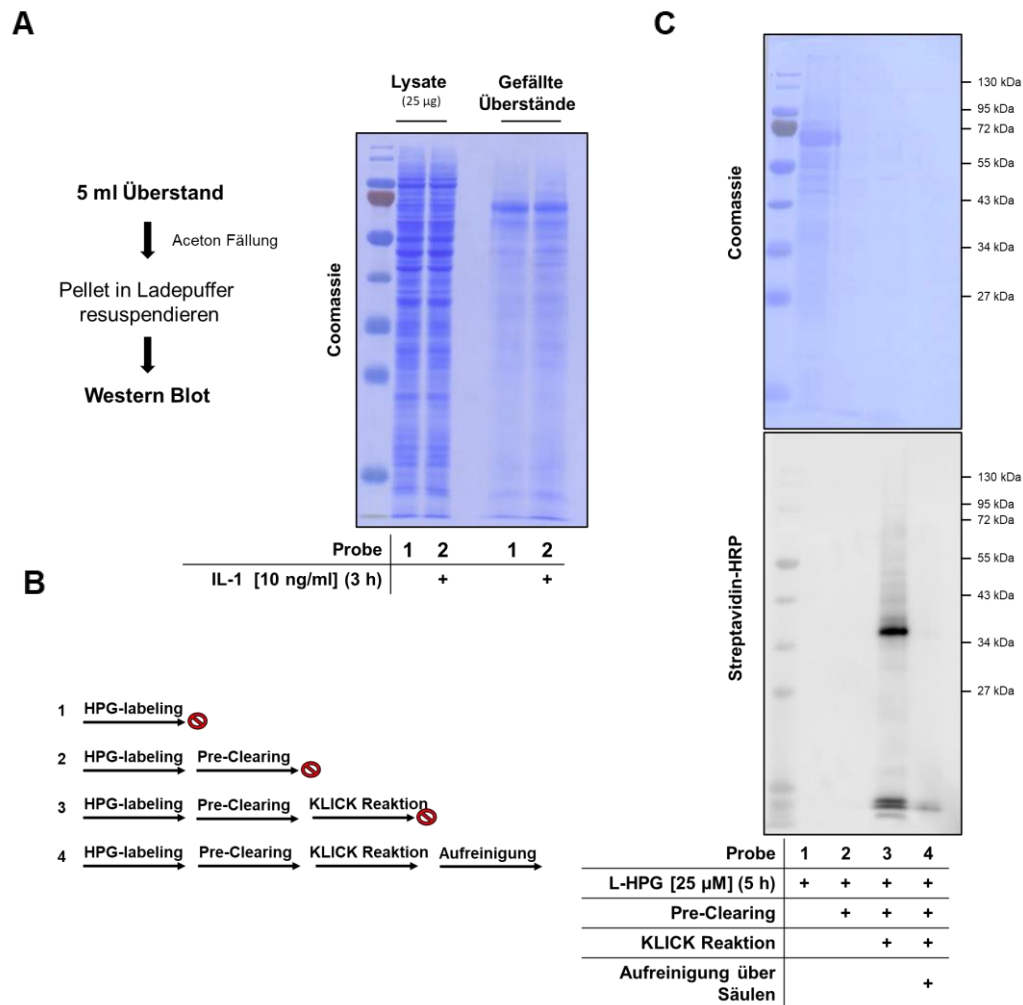


Abb. 4.58 Austestung der Einzelschritte des Protokolls zur L-HPG Markierung mit nachfolgender KLICK Reaktion für die Analyse von Zellkulturüberständen.

(A) HCT116 Zellen wurden für 3 h mit IL-1 stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. 25 µg der Lysate wurden im Western Blot eingesetzt. Der Zellkulturüberstand wurde ebenfalls geerntet und mittels Aceton präzipitiert. Das Pellet wurde in SDS-Ladepuffer resuspendiert und vollständig für die Western Blot Analyse eingesetzt. Der Blot wurde zur Proteinvisualisierung mittels Coomassie Blue gefärbt. (B und C) HCT116 wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium ohne FBS kultiviert. Während dieser 5 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 µM] behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und vollständig gefällt. Probe 1 wurde daraufhin direkt in SDS-Ladepuffer resuspendiert. Die weiteren Pellets wurden in Lysepuffer resuspendiert und ein *PreClearing* mit Streptavidin-Beads wurde durchgeführt. Probe 2 wurde daraufhin direkt mittels Aceton präzipitiert. Für die weiteren Proben wurde eine KLICK Reaktion durchgeführt. Anschließend wurden auch die Proteine dieser Proben mittels Aceton präzipitiert. Nach der Präzipitation wurden die Pellets in Methanol gewaschen und getrocknet. Probe 2 und 3 wurden in SDS-Ladepuffer resuspendiert. Probe 4 wurde in 1 % SDS in PBS resuspendiert und eine Entsalzung über spezielle *Desalting*-Säulen wurde durchgeführt. Anschließend wurde auch diese Probe für Western Blot Analysen vorbereitet. Die biotinylierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert. Der Blot wurde zur Proteinvisualisierung mittels Coomassie Blue gefärbt.

Um das Protokoll zu optimieren, wurde der Einfluss des *PreClearings* auf die Proteinausbeute und die Detektion von neu-synthetisierten Proteinen detaillierter untersucht. HCT116 Zellen wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium ohne FBS kultiviert und zeitgleich für 5 h metabolisch mittels L-HPG markiert. Weitere Zellen wurden in Vollmedium ohne FBS kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und für die KLICK Reaktion eingesetzt. Dabei wurden präzipitierte Proteine einiger Proben einem *PreClearing* über Streptavidin-Beads unterzogen, um natürlich biotinylierte Proteine zu entfernen. Bei den übrigen Proben wurde

das *PreClearing* hingegen ausgelassen. Nach der KLINK Reaktion wurden einige Proben direkt für den Western Blot vorbereitet, während die biotinylierten Proteine weiterer Proben über Streptavidin-Beads aufgereinigt wurden. Anschließend wurden alle Proben im Western Blot analysiert. Die Coomassie Färbung des Western Blots (Abb. 4.59 A) zeigte erneut, dass das *PreClearing* die Gesamtproteinausbeute verringerte. Das *PreClearing* führte zu einem Verlust einiger Proteine. Des Weiteren zeigte die Färbung, dass durch das *PreClearing* das restliche Serumalbumin (66 kDa), welches vermutlich noch an den Zellen haftete, entfernt wurde. Wurde die Aufreinigung der biotinylierten Proteine (Pulldown) über Streptavidin-Beads vorgenommen, war die Gesamtproteinausbeute ebenfalls leicht verringert, wenn das *PreClearing* durchgeführt wurde. Die Detektion der biotinylierten Fraktion über Streptavidin-HRP deutete allerdings darauf hin, dass das *PreClearing* keinen Einfluss auf die Gesamtmenge an biotinylierten Proteinen hatte. Daraus ließ sich schließen, dass das *PreClearing* zu einem Verlust einiger Proteine führte. Allerdings handelte es sich bei den verlorenen Proteinen überwiegend um Proteine, welche nicht durch L-HPG markiert wurden.

Da die Detektion von neu-synthetisierten Proteinen aus dem Zellkulturüberstand nun etabliert war, sollte untersucht werden, ob die Detektion der neu-gebildeten Proteine auch funktionierte, wenn die Zellen mit 1 % Serum (FBS) kultiviert wurden. Dies wäre ein wichtiger konzeptioneller Vorteil, um den Hungerstress als Einflussgröße zu vermeiden. HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches kein FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Zeitgleich erfolgte die Markierung mit L-HPG. Einige Zellen wurden zusätzlich für 6 h mit IL-1 stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und die KLINK Reaktion wurde durchgeführt. Einige Pellets wurden nach der KLINK Reaktion direkt für die Western Blot Analyse vorbereitet. Weitere Proteinpellets wurden für den Streptavidin-Pulldown eingesetzt, um biotinylierte Proteine aufzureinigen. Anschließend wurde die Proteinausbeute und die Menge an biotinylierten Proteinen im Western Blot (Abb. 4.59 B) analysiert. Die Coomassie Färbung der Membran zeigte, dass in 1 % FBS eine große Menge Serumalbumin (BSA) enthalten war, welche zu einer Überladung des SDS-Gels führte. Wurde allerdings der Streptavidin-Pulldown durchgeführt, so konnte das BSA beinahe vollständig entfernt werden. Die Detektion der biotinylierten Proteine über Streptavidin-HRP zeigte zudem, dass das Serum die KLINK Reaktion nicht beeinflusste. Es wurde eine vergleichbare Menge biotinylierter Proteine im Vergleich zu Zellen, welche ohne FBS kultiviert wurden, detektiert. Wurden die Zellen zudem mit IL-1 stimuliert, war die Menge an neu-synthetisierten Proteinen in den Zellkulturüberständen erhöht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Markierung von neu-synthetisierten Proteinen und die Konjugation an Biotin auch erfolgreich war, wenn die Zellen in einer geringen Menge Serum kultiviert wurden.

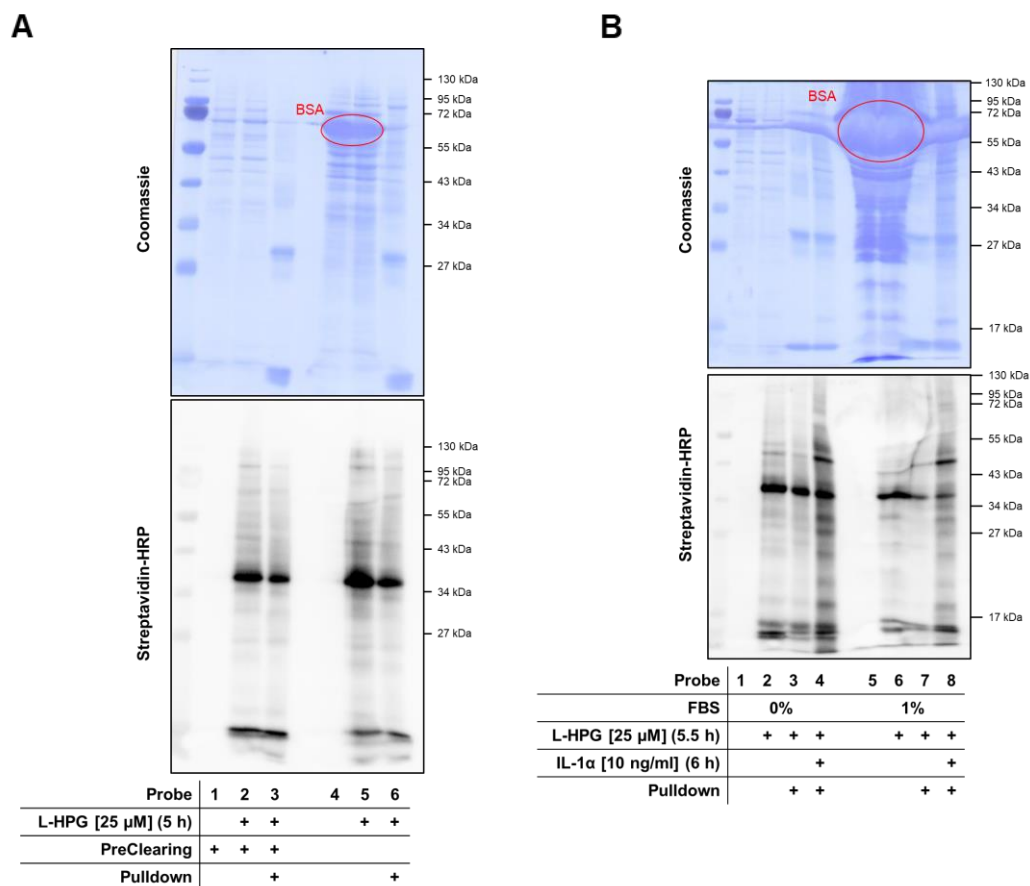


Abb. 4.59 Anpassungen des Protokolls zur Analyse des naszierenden Sekretoms in der Anwesenheit von Serum.

(A) HCT116 Zellen wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium / 0 % FBS kultiviert. Die Zellen wurden für 5 h mit L-HPG [25 μ M] metabolisch markiert. Weitere Zellen wurden weiterhin in Vollmedium / 0 % FBS kultiviert und blieben unbehandelt. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und die Proteine mittels Aceton präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden einem *PreClearing* (Probe 1-3) unterzogen oder dieser Schritt wurde ausgelassen (Probe 4-6). Die KLICK Reaktion wurde durchgeführt, um markierte Proteine zu biotinylieren. Einige Proben wurden direkt für die Western Blot Analyse vorbereitet (Probe 1-2 und Probe 4-5). Aus weiteren Proben wurden die biotinylierten Proteine über Streptavidin Beads aufgereinigt (Probe 3 und Probe 6). Die Proben wurden im Western Blot analysiert. Die biotinilierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert. Die Färbung der Membran erfolgte mittels Coomassie Blue. Serumalbumin (BSA) wurde rot markiert.

(B) HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium mit 1 % FBS oder ohne (0 %) FBS kultiviert. Die Zellen wurden für 6 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Zusätzlich wurden Zellen für 5.5 h mit L-HPG [25 μ M] metabolisch markiert. Weitere Zellen wurden weiterhin in Vollmedium mit 1 % FBS oder ohne FBS kultiviert und blieben unbehandelt. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und die Proteine mittels Aceton präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden einem *PreClearing* unterzogen und anschließend über die KLICK Reaktion biotinyliert. Einige Proben wurden direkt für die Western Blot Analyse vorbereitet (Probe 1-2 und Probe 5-6). Aus weiteren Proben wurden die biotinylierten Proteine über Streptavidin Beads aufgereinigt (Probe 3-4 und Probe 7-8). Die Proben wurden im Western Blot analysiert. Die biotinilierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert. Die Färbung der Membran erfolgte mittels Coomassie Blue. Rote Markierung: Serumalbumin (BSA).

Neben den Western Blot Analysen, welche lediglich Aussagen über die Gesamtmenge an biotinylierten Proteinen erlaubten, war es natürlich interessant die naszierenden Proteine aus den Zellkulturüberständen zu identifizieren. Dafür sollten die präzipitierten Proteine aus den Überständen, welche mittels KLICK Reaktion an Biotin gekoppelt wurden, massenspektrometrisch analysiert werden. In einem ersten Versuch sollte getestet werden, ob sich die Proteine überhaupt massenspektrometrisch identifizieren lassen. Des Weiteren wurden verschiedene Bedingungen ausgetestet, um ein finales Protokoll festlegen zu können.

HCT116 Zellen wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 5 h wurden die Zellen mit L-HPG metabolisch markiert. Als Kontrolle wurden Zellen, welche nicht mit L-HPG behandelt wurden, ebenfalls in Methionin-freiem Medium kultiviert, welchem L-Methionin beigesetzt wurde. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet. Mit zuvor präzipitierten Proteinen wurde entweder ein *PreClearing* durchgeführt oder dieser Schritt wurde weggelassen. Die KLINK Reaktion wurde wiederum mit allen Proben durchgeführt. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine entweder direkt in der Western Blot Analyse oder der Massenspektrometrie analysiert oder die biotinylierten Proteine wurden vorerst über Streptavidin-Beads aufgereinigt. Anschließend wurde die Gesamtproteinausbeute und die Menge an biotinylierten Proteinen im Western Blot analysiert. Die Coomassie Färbung (Abb. 4.60) zeigte erneut, dass das *PreClearing* zu einem Verlust einiger Proteine führte, wenn die Zellen ohne FBS kultiviert wurden. Wurden die Zellen hingegen mit 1 % FBS kultiviert, so wurde die Gesamtproteinmenge durch das *PreClearing* nicht sichtbar reduziert. Allerdings war hier das Serum erneut sehr präsent und überlagerte eventuell andere Proteine. Nach Durchführung des Streptavidin-Pulldown war die Gesamtproteinmenge reduziert, da die nicht-biotinylierten Proteine entfernt wurden. Auch das BSA konnte durch den Pulldown nahezu vollständig entfernt werden. Die Detektion der biotinylierten Proteine mittels Streptavidin-HRP zeigte, dass die L-HPG Markierung zu einer Detektion von neu-synthetisierten Proteinen führte. Dabei wurden Proteine jeglicher Größen detektiert (zwischen 10 kDa und 130 kDa). Wurden die Zellen lediglich mit L-Methionin behandelt, konnten keine biotinylierten Peptide detektiert werden. Nach Durchführung des Streptavidin-Pulldowns war die biotinylierte Fraktion stets verringert. Des Weiteren zeigten die Analysen, dass die Kultivierung der Zellen ohne FBS zu einer verstärkten Detektion von biotinylierten Proteinen führte.

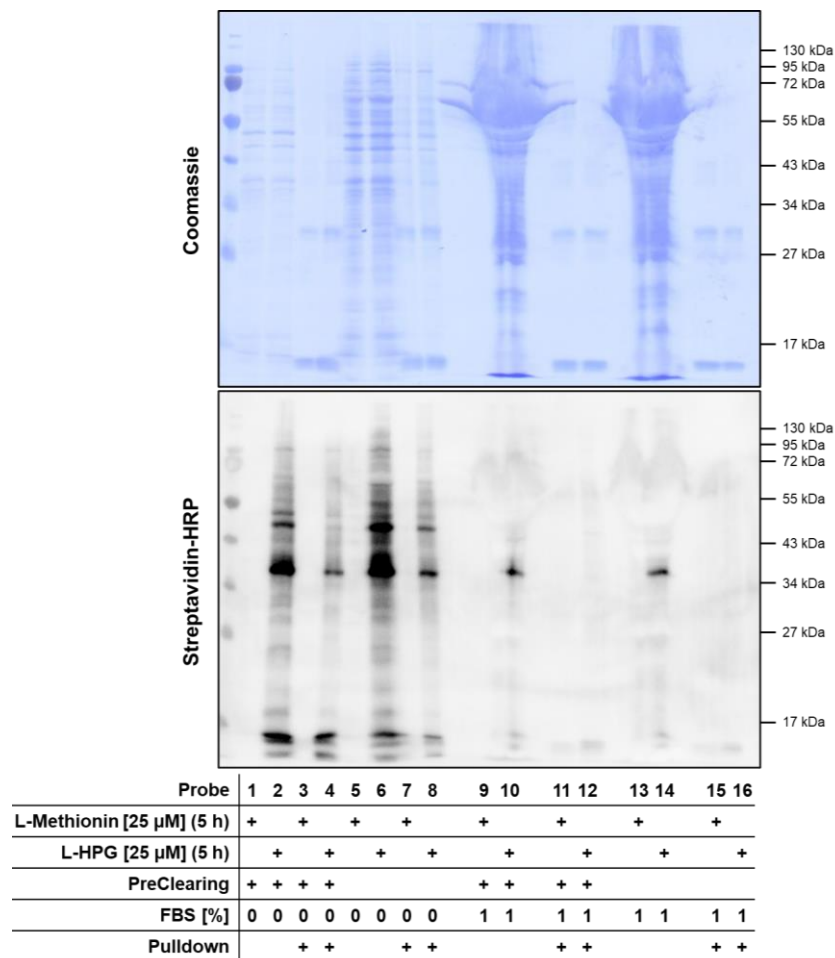


Abb. 4.60 Austestung der Analyse des naszierenden Sekretoms mittels L-HPG Markierung und KLINK Chemie über Western Blot als Vorbereitung für LC-MS/MS Analysen.

HCT116 wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium mit 1 % FBS oder ohne (0 %) FBS kultiviert. Während dieser 5 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 µM] oder L-Methionin [25 µM] behandelt. Die präzipitierten Proteine aus den Überständen wurden durch ein *PreClearing* gereinigt (Probe 1-4 und Probe 9-12) oder dieser Schritt wurde ausgelassen (Probe 5-8 und Probe 13-16). L-HPG markierte Proteine wurden über die KLINK Reaktion biotinyliert. Die erneut präzipitierten Proteine wurden direkt in Western Blot Analysen eingesetzt (Probe 1-2; 5-6 und Probe 9-10; 13-14) oder es wurde vorerst eine Streptavidin-Aufreinigung der biotinylierten Peptide durchgeführt (Probe 3-4; 7-8 und Probe 11-12; 15-16). Die Proben wurden im Western Blot analysiert. Die biotinylierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert. Die Färbung der Membran erfolgte mittels Coomassie Blue.

Um die biotinylierten und damit neu-synthetisierten Proteine zu identifizieren, wurden 25 µl der KLINK Konjugate bzw. die Streptavidin-Beads massenspektrometrisch (mittels LC-MS/MS) in einem Einzelexperiment ohne technische Replikate analysiert. Insgesamt wurden 1584 Peptide identifiziert, deren Intensitäten über 16 log₂ Skalen (2^{10} - 2^{26}) verteilt waren. Diese Daten demonstrierten, dass das Protokoll eine breite Analyse des Sekretoms erlaubte. Eine Anreicherungsanalyse über die Metascape Software (Zhou et al., 2019) zeigte, dass die 1584 identifizierten Peptide überwiegend an intrazellulären Prozessen beteiligt waren (Abb. 4.61). Es wurden beispielsweise Proteine identifiziert, die eine Rolle in eher generellen biologischen Prozessen wie *metabolism of RNA* (R-HSA-8953854), *cell cycle* (R-HSA-16400170), *ribosome biogenesis* (GO:0042254), *protein folding* (GO:0006457) oder *regulation of translation* (GO:0006417) spielten, welche in allen Zellen vorkommen.

1584 identifizierte Proteine (IDs)

	Beschreibung	$-\log_{10}(P)$
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	100
R-HSA-8963854	Metabolism of RNA	100
CORUM:3065	Nop58p-associated pre-rRNA complex	100
R-HSA-1640170	Cell Cycle	75.46
WP3888	VEGFA/VEGFR2 signaling pathway	66.62
GO:0042254	ribosome biogenesis	64.31
R-HSA-6798695	Neutrophil degranulation	59.85
R-HSA-9716542	Signaling by Rho GTPases, Miro GTPases and RHOBTB3	53.63
GO:0006457	protein folding	52.42
R-HSA-5653656	Vesicle-mediated transport	43.09
GO:1903311	regulation of mRNA metabolic process	42.9
WP107	Translation factors	40.18
GO:0006417	regulation of translation	38.28
GO:0042176	regulation of protein catabolic process	31.21
R-HSA-9609690	HCMV Early Events	31.19
hsa01200	Carbon metabolism	31.02
R-HSA-109582	Hemostasis	29.48
hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	28.92
GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis	28.6
CORUM:5380	TRBP containing complex (DICER, RPL7A, EIF6, MOV10 and subunits of the 60S ribosomal particle)	28.55

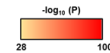


Abb. 4.61 Anreicherungsanalyse der 1584 identifizierten Proteine über Metascape nach Durchführung der KLINK Reaktion.

HCT116 wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium mit 1 % FBS oder ohne (0 %) FBS kultiviert. Während dieser 5 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 μ M] oder L-Methionin [25 μ M] behandelt. Die präzipitierten Proteine aus den Überständen wurden durch ein *PreClearing* gereinigt oder dieser Schritt wurde ausgelassen. L-HPG markierte Proteine wurden anschließend über die KLINK Reaktion biotinyliert. Die erneut präzipitierten Proteine wurden direkt analysiert oder es wurde vorerst eine Streptavidin-Aufreinigung der biotinylierten Peptide durchgeführt. Die Proteine eines biologischen Replikats wurden über LC-MS/MS analysiert. Alle identifizierten Proteine (1584 IDs) wurden über die Metascape Software analysiert. Dargestellt sind die TOP 20 angereicherten Prozesse und der $-\log_{10}(P)$ der Überrepräsentationsanalyse.

Um den Einfluss des *PreClearings* und der Serumkultivierung auf die Anreicherung von L-HPG markierten und biotinylierten Proteinen untersuchen zu können, wurden die Daten mit Hilfe von Venn Diagrammen (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) weiter analysiert. Hierfür wurden alle identifizierten Proteine (IDs) verwendet, welche nach Durchführung des Streptavidin-Pulldowns durch die L-HPG Markierung im Vergleich zur Methionin-Behandlung mit einem $\log_2 FC \geq 1$ angereichert wurden. Die Venn-Analyse (Abb. 4.62) zeigte, dass nach der Kultivierung der Zellen ohne FBS insgesamt 444 Proteine durch die L-HPG Markierung angereichert wurden, unabhängig davon ob ein *PreClearing* Schritt erfolgte. Lediglich 159 Peptide wurden nur dann angereichert, wenn das *PreClearing* ausgesetzt wurde und 45 Proteine wurden ausschließlich nach der Durchführung des *PreClearings* identifiziert. Wurden die Zellen hingegen in Medium kultiviert, welches 1 % FBS enthielt, wurden nur 187 IDs sowohl bei Durchführung des *PreClearings* als auch ohne *PreClearing* mindestens zweifach angereichert. 78 Proteine wurden nur dann angereichert, wenn das *PreClearing* übersprungen wurde. Des Weiteren wurden 64 IDs identifiziert, die nur nach der Durchführung des *PreClearing* angereichert waren. Die Überlagerung der IDs, welche ohne *PreClearing* und mit *PreClearing* mindestens zweifach angereichert wurden, wenn die Zellen mit L-HPG behandelten wurden, war groß. Dies deutete darauf hin, dass durch das *PreClearing* überwiegend nicht-biotinylierte Proteine verloren gingen. Obwohl es sich um ein Einzelexperiment handelte, wurde aufgrund dieser Daten entschieden, den *PreClearing* Schritt in zukünftigen Experimenten wegzulassen, um so viele Protein wie möglich zu erfassen. Des Weiteren zeigten diese Ergebnisse, dass insgesamt weniger Proteine mindestens zweifach angereichert wurden, wenn die Zellen in 1 % FBS kultiviert wurden, ein Befund, der später rekapituliert wurde.

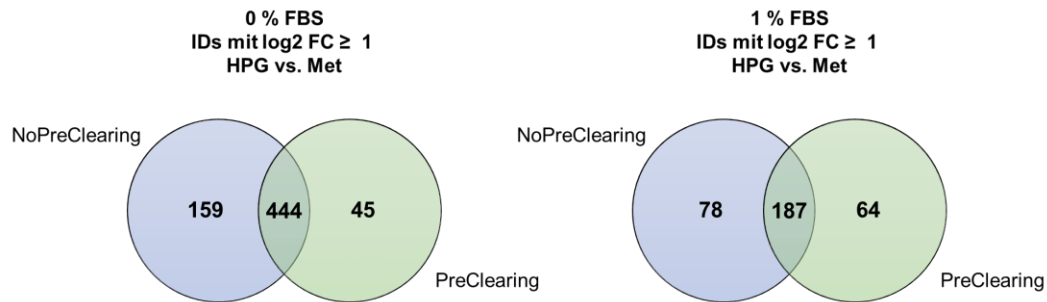


Abb. 4.62 Vergleich der durch L-HPG angereicherten Proteine bei verschiedenen Bedingungen.

HCT116 wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium mit 1 % FBS oder ohne (0 %) FBS kultiviert. Während dieser 5 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 μ M] oder L-Methionin [25 μ M] behandelt. Die präzipitierten Proteine aus den Überständen wurden durch ein *PreClearing* gereinigt oder dieser Schritt wurde ausgelassen. L-HPG markierte Proteine wurden anschließend über die KLINK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierten Proteine wurden über Streptavidin-Beads aufgereinigt. Die biotinylierten Proteine eines biologischen Replikats wurden über LC-MS/MS analysiert. Venn-Analysen zum Einfluss des *PreClearings* wurden durchgeführt. In die Analyse einbezogen wurden Proteine, welche innerhalb folgender Filterung bei einem Vergleich der L-HPG-markierten Probe mit der Methionin-behandelten Probe lagen: $\log_2 FC \geq 1$.

Zusätzlich zum Einfluss des *PreClearings* auf die Anreicherung von L-HPG markierten Proteinen, sollte auch der Einfluss der Hungerbedingungen auf die Zellen untersucht werden. Venn-Analysen wurden durchgeführt. In die Analyse einbezogen wurden Proteine, welche nach Durchführung des Streptavidin-Pulldowns in L-HPG markierten Zellen gegenüber Methionin-behandelten Zellen mindestens zweifach angereichert wurden ($\log_2 FC \geq 1$). Wurde kein *PreClearing* durchgeführt (Abb. 4.63 A), wurden 193 Proteine sowohl in Zellen, welche mit 1 % FBS kultiviert wurden, als auch in Zellen, welche ohne FBS kultiviert wurden, mindestens zweifach durch die L-HPG Markierung angereichert. Des Weiteren wurden 410 Proteine nur dann angereichert, wenn die Zellen ohne FBS kultiviert bzw. einem Hungerstress ausgesetzt waren. Im Gegensatz dazu wurden lediglich 72 Proteine identifiziert, welche nur nach der Kultivierung der Zellen in 1 % FBS eine mindestens zweifache Anreicherung aufwiesen. Die 410 IDs, welche lediglich angereichert wurden, wenn die Zellen ohne FBS kultiviert wurden, wurden über Anreicherungsanalysen mittels der Metascape Software genauer untersucht (Abb. 4.63 B). Erneut wurden überwiegend intrazelluläre Prozesse angereichert. Dazu gehörten die Prozesse *protein folding* (GO:0006457), *cell cycle* (R-HSA-1640170), *spliceosome* (hsa03040) oder *chromosome organization* (GO:0051276). Allerdings war der am signifikantesten angereicherte Prozess ($-\log_{10}(P) = 81.8$) der Prozess *cellular response to stress* (R-HSA-2262752). Auch der Prozess *cellular response to heat stress* (R-HSA-3371556) tauchte unter den TOP 20 angereicherten Prozessen auf. Dies deutete darauf hin, dass die Kultivierung der Zellen ohne FBS zu einem Stress-bedingten veränderten Sekretom der Zellen führte, in welchem Proteine der Stressantwort überrepräsentiert waren. Zusätzlich stellte sich an dem Punkt die Frage, ob die erhöhte Anzahl an angereicherten Proteinen in gehungerten Zellen durch einen vermehrten Zelltod zu erklären

waren, da sterbende Zellen möglicherweise vermehrt intrazelluläre Proteine in den Zellkulturüberstand entlassen.

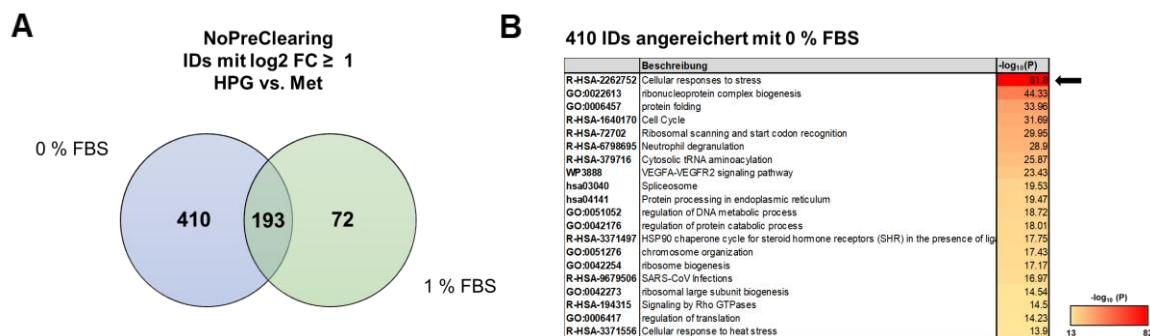


Abb. 4.63 Analyse des naszierenden Sekretoms nach Kultivierung der Zellen mit 0 % oder mit 1 % FBS.

HCT116 wurden für 5 h in Methionin-freiem Medium mit 1 % FBS oder ohne (0 %) FBS kultiviert. Während dieser 5 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 μ M] oder L-Methionin [25 μ M] behandelt. Die präzipitierten Proteine wurden über die KLICK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierten Proteine wurden anschließend über Streptavidin-Beads aufgereinigt. Die aufgereinigten, biotinylierten Proteine eines biologischen Replikats wurden über LC-MS/MS analysiert. (A) Venn-Analysen zum Einfluss der Serumkultivierung wurden durchgeführt. In die Analyse einbezogen wurden Proteine, welche innerhalb folgender Filterung bei einem Vergleich der L-HPG-markierten Probe mit der Methionin-behandelten Probe lagen: $\log_2 FC \geq 1$. (B) Anreicherungsanalysen der 410 IDs, welche lediglich nach der Kultivierung der Zellen ohne FBS mindestens zweifach angereichert wurden, mittels Metascape. Dargestellt sind die TOP 20 angereicherten Prozesse und die $-\log_{10} P$ Werte der Überrepräsentationsanalyse.

4.4.3 Systematische Untersuchung des IL-1 induzierten Sekretoms mittels L-HPG Markierung, KLICK Chemie und LC-MS/MS

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die IL-1 regulierten und sekretierten Proteine systematisch in lebenden Zellen zu charakterisieren. Hierfür wurde das zuvor etablierte und optimierte Protokoll zur L-HPG Markierung der Zellen mit anschließender KLICK Reaktion und LC-MS/MS verwendet. Da im Zellkulturüberstand auch Proteine enthalten sind, welche von sterbenden Zellen freigesetzt werden könnten, sollte zunächst der Einfluss der L-HPG Markierung und der IL-1 Stimulation auf die Viabilität der Zellen untersucht werden. HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium mit 1 % FBS oder gänzlich ohne FBS kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG markiert oder mit L-Methionin behandelt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1 stimuliert oder unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die Zellen mikroskopiert und geerntet oder es wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Die Mikroskopieaufnahmen (Abb. 4.64 A) zeigten, dass die Kultivierung der Zellen ohne FBS keinen Einfluss auf die Zellzahl im Vergleich zu Zellen, welche mit 1 % FBS kultiviert wurden, hatte. Des Weiteren hatte auch die L-HPG-Behandlung keinen Einfluss auf die Zellzahl im Vergleich zu Methionin-behandelten Zellen. Wurden die Zellen parallel mit L-HPG markiert und mit IL-1 stimuliert, war die Anzahl an abgerundeten Zellen allerdings erhöht. Die Ergebnisse des MTS-Assays (Abb. 4.64 B) deuteten darauf hin, dass die Kultivierung der Zellen ohne FBS keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen hatte. Ausschließlich wenn die Zellen ohne FBS kultiviert und zusätzlich mit L-HPG und IL-1

behandelt wurden, war die Zellviabilität auf 94.6 % reduziert. Die geernteten Zellen wurden mittels Propidiumiodid gefärbt und anschließend über Durchflusszytometrie analysiert. Die Propidiumiodid-Färbung erlaubt eine Aussage über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Propidiumiodid interkaliert mit der DNA von lebenden Zellen. Über die Durchflusszytometrie und die damit verbundene Bestimmung der Fluoreszenz der einzelnen Zellen, können Rückschlüsse über die DNA-Menge und damit über die Stadien des Zellzyklus gezogen werden. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Abb. 4.64 C) zeigten, dass die verschiedenen Behandlungen keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus (G1, S, G2) hatten. Wurden die Zellen mit Methionin oder L-HPG behandelt, befanden sich ca. 2-3 % der Zellen in der SubG1 Phase des Zellzyklus. Die DNA dieser Zellen war fragmentiert und die Zellen somit apoptotisch. Wurden die Zellen hingegen mit Methionin behandelt und zusätzlich mit IL-1 stimuliert, befanden sich ca. 5-6 % der Zellen in der SubG1 Phase (5.57 % bei Kultivierung ohne FBS; 4.67 % bei Kultivierung mit 1 % FBS). Die IL-1 Stimulation führte somit zu einem leichten Anstieg an Zellen, welche apoptotisch waren. Wurden die Zellen Hungerstress ausgesetzt, mit L-HPG behandelt und zusätzlich mit IL-1 stimuliert waren 10 % der Zellen apoptotisch. Wurden die Zellen im Gegensatz mit 1 % FBS kultiviert, stieg die Anzahl der Zellen in der SubG1 Phase auf 7.8 % an, wenn die Zellen mit L-HPG und IL-1 behandelt wurden. Die simultane Behandlung der Zellen mit L-HPG und IL-1 sorgte somit vermehrt für Zelltod. Wurden die Zellen zusätzlich gehungert, fiel dieser Effekt verstärkt aus. Im Umkehrschluss zeigten die Daten allerdings, dass unter allen verwendeten Bedingungen mindestens 90 % der Zellen einen unveränderten Zellzyklusstatus aufwiesen und lebensfähig waren.

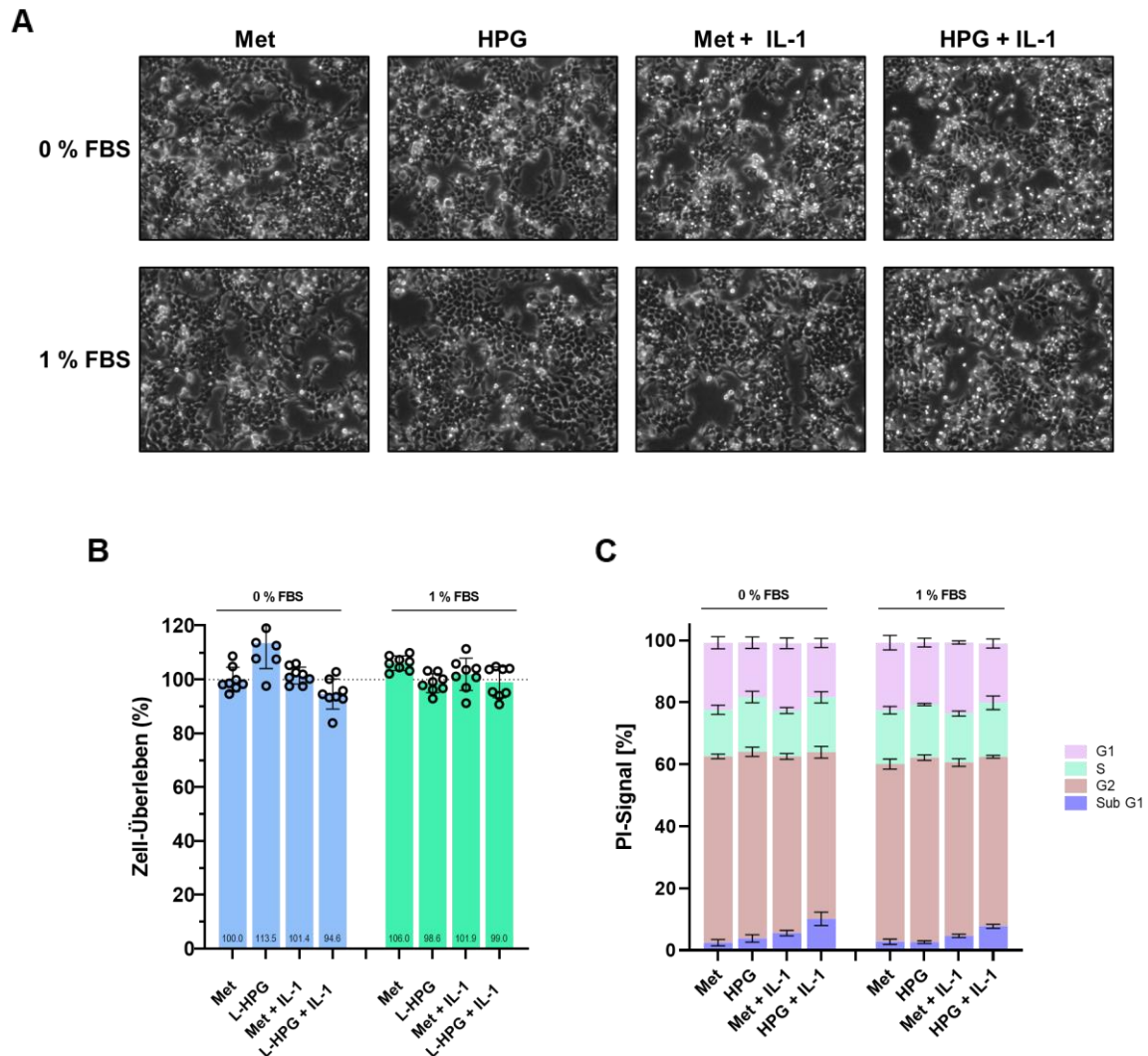


Abb. 4.64 Die L-HPG Markierung und die IL-1 Stimulation beeinflussen die Viabilität der Zellen moderat.

HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 μ M] behandelt oder Methionin [25 μ M] wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert oder unbehandelt gelassen. (A) Die Zellen wurden mikroskopiert (Vergrößerung: 10 x). (B) Ein MTS-Assay wurde durchgeführt. Die Hintergrundabsorption des Mediums wurde von allen Werten abgezogen. Die Normalisierung erfolgte auf die Methionin-behandelten Zellen, welche mit 0 % FBS kultiviert wurden. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von zwei biologischen Replikaten à vier technischen Replikaten dargestellt. (C) Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie geerntet. Die DNA wurde für die Messung mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei biologischen Replikaten dargestellt.

Das naszierende IL-1-induzierte Sekretom sollte in dieser Arbeit in Anwesenheit und in Abwesenheit von Serum metabolisch markiert und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Dafür wurden HCT116 Zellen für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches kein FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden Zellen mit L-HPG metabolisch markiert oder L-Methionin wurde dem Medium zugesetzt. Zusätzlich wurden die Zellen für 6 h mit IL-1 stimuliert oder unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände geerntet und die KLINK Reaktion ohne vorheriges *PreClearing* durchgeführt. Anschließend wurden die biotinylierten Proteine über Streptavidin-Beads aufgereinigt. 40 % der Proben wurden für die Proteindetektion im Western Blot eingesetzt, während die restlichen 60 %

massenspektrometrisch analysiert wurden. Es wurden insgesamt drei biologische Replikate durchgeführt. In der LC-MS/MS wurden zudem jeweils zwei technische Wiederholungen vorgenommen, so dass in diesem Experiment 48 LC-MS/MS Datensätze ausgewertet wurden.

Die Western Blot Analyse und deren Quantifizierung (Abb. 4.65) zeigte, dass die Markierung von neu-synthetisierten Proteinen, welche von den Zellen in den Zellkulturüberstand abgegeben wurden, reproduzierbar funktionierte. Wenn die Zellen ohne FBS kultiviert wurden, zeigte die Coomassie Färbung der Membran, dass die Proteinausbeute durch die IL-1 Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen leicht erhöht war. Wurden die Zellen in Anwesenheit von Serum kultiviert, wurde eine gleichmäßige Gesamteproteinausbeute zwischen allen Bedingungen festgestellt. Insgesamt fiel die Proteinausbeute geringer aus, wenn die Zellen mit 1 % FBS kultiviert wurden. Die Detektion der biotinylierten Proteinfraction mittels Streptavidin-HRP deutete darauf hin, dass biotinylierte Peptide ausschließlich detektiert wurden, wenn die Zellen mit L-HPG behandelt wurden. Dabei erfolgte die Detektion von vielen Proteinen, welche ein Molekulargewicht zwischen 10 kDa und 130 kDa aufwiesen. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-1 stimuliert, nahm die Menge an biotinylierten Proteinen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Serum im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu. Insgesamt war die Menge an detektierten Proteinen in Zellen, welche in Anwesenheit von Serum gehalten wurden, verringert. Vor allem unter unstimulierten Bedingungen wurde nur eine geringe Menge an biotinylierten Proteinen im Vergleich zu Zellen, welche ohne Serum kultiviert wurden, detektiert. Dies deutete darauf hin, dass die Kultivierung der Zellen ohne Serum einen Einfluss auf das Sekretom der Zellen hatte.

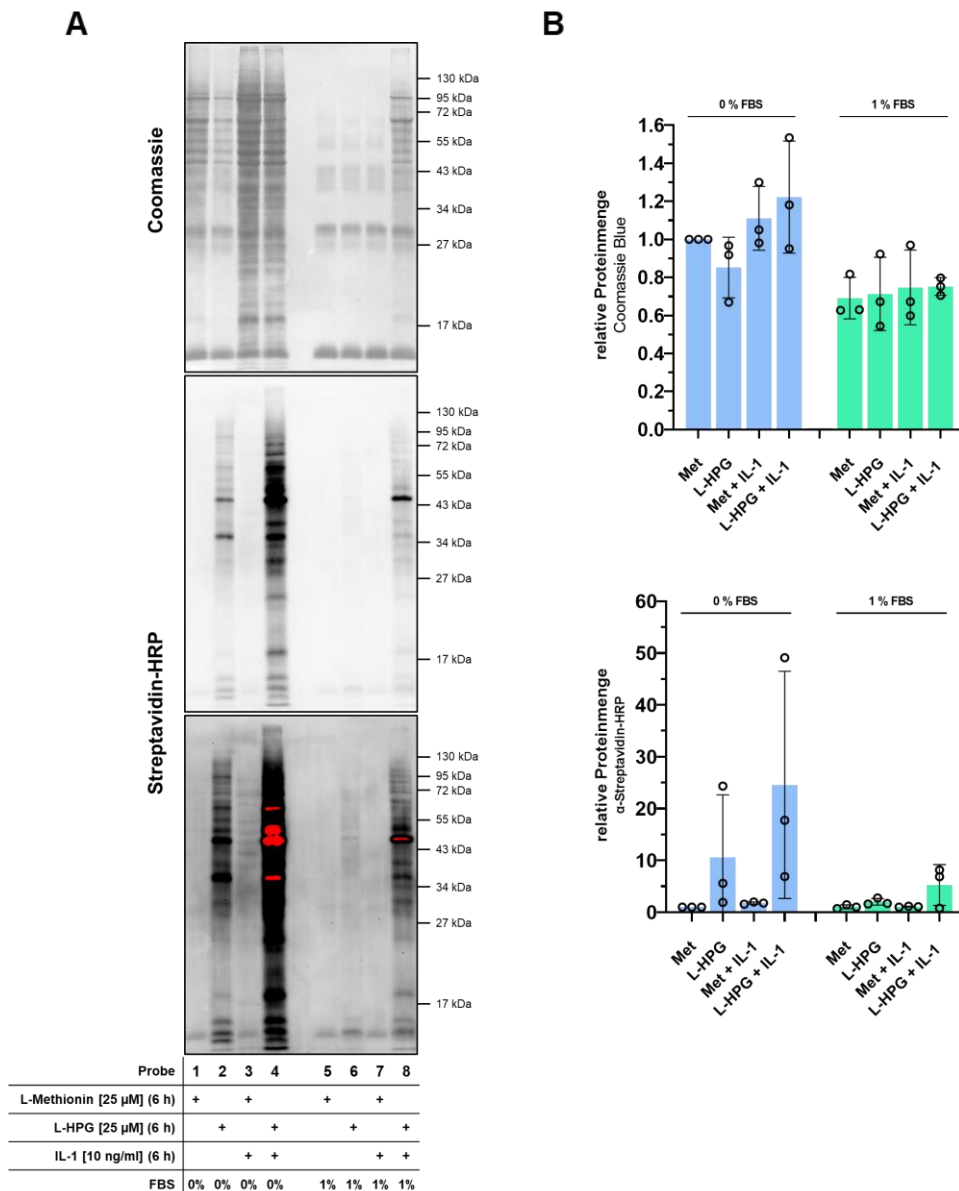


Abb. 4.65 Analyse der Gesamteproteinmenge und der biotinylierten Proteinfraction des IL-1 induzierten Sekretoms.

HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 µM] behandelt oder Methionin [25 µM] wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die präzipitierten Proteine aus den Zellkulturüberständen wurden über die KLICK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierte Proteinfraction wurde über Streptavidin-Beads aufgereinigt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die biotinylierte Proteinfraction wurde über Streptavidin-HRP visualisiert. Die Färbung der Membran erfolgte mittels Coomassie Blue. (A) Es ist eine repräsentative Analyse aus einem der drei Experimente dargestellt. (B) Die Intensitäten der Chemilumineszenz bzw. der Färbung wurden auf die Probe normalisiert, welche in Abwesenheit von FBS kultiviert und mit Methionin behandelt wurde. Die Quantifizierung wurde mit der Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt. Es sind jeweils die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt.

Die Auswertung der Massenspektrometrie erfolgte über die MaxQuant Software und Perseus. Die Analyse zeigte, dass die Häufigkeiten der identifizierten Proteine (IDs) über 16 log₂-Skalen verteilt waren (2^{10} - 2^{26}). Insgesamt wurden 1790 Proteine identifiziert. Proteine, welche von MaxQuant als Kontaminanten klassifiziert wurden, wie beispielsweise Keratin, Streptavidin und Albumin, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Wurden die Zellen in Abwesenheit

von Serum kultiviert, wurden zwischen 1000 und 1500 Proteine identifiziert (Abb. 4.66). Wurden die Zellen mit L-HPG markiert und zusätzlich mit IL-1 stimuliert, nahm die Gesamtproteinmenge leicht zu und es wurden insgesamt 1742 Proteine (Mittelwert von drei biologischen Replikaten) identifiziert. Wurden die Zellen hingegen mit 1 % Serum kultiviert, wurden lediglich zwischen 120 und 320 Proteine identifiziert. Ausschließlich wenn die Zellen mit L-HPG behandelt und mit IL-1 stimuliert wurden, konnten im Schnitt 1353 Proteine identifiziert werden. Die IL-1 Stimulation hatte somit einen großen Einfluss auf das Sekretom der Zellen, welche in Anwesenheit von FBS gehalten wurden. Zellen, welche zusätzlich Hungerstress ausgesetzt waren, zeigten bereits ohne IL-1 Stimulation eine erhöhte Sekretion von neu-synthetisierten Proteinen. Die Ergebnisse der LC-MS/MS waren somit vergleichbar mit der Western Blot Analyse (Abb. 4.65).

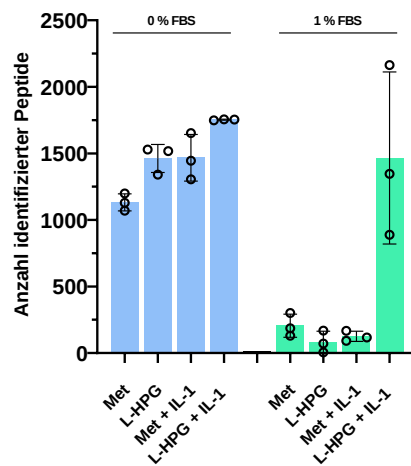


Abb. 4.66 Anzahl der mittels LC-MS/MS identifizierten Proteine (IDs) des IL-1 induzierten Sekretoms.

HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 µM] behandelt oder Methionin [25 µM] wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die präzipitierten Proteine aus den Zellkulturüberständen wurden über die KLICK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierte Proteinfraction wurde über Streptavidin-Beads aufgereinigt und über LC-MS/MS analysiert. Dargestellt sind die Anzahlen der identifizierten Peptide (IDs) der massenspektrometrischen Analyse. Es handelt sich dabei um Mittelwerte (±Standardabweichung) von drei biologischen Replikaten à zwei technischen Replikaten.

Zusätzlich wurde eine quantitative Analyse basierend auf den statistisch signifikanten Anreicherungen der Proteinhäufigkeiten in L-HPG behandelten Zellen gegenüber Methionin-behandelten Zellen durchgeführt. Vulkanplots (Abb. 4.67) veranschaulichten die (signifikanten) Anreicherungen von Proteinen in L-HPG behandelten Zellen. Es wurden jeweils der $\log_2$ FC gegen den $-\log_{10}$ P Wert aufgetragen. Der Vergleich wurde jeweils zu den Methionin-behandelten Zellen gezogen. Näher betrachtet wurden anschließend IDs, welche folgende Bedingungen erfüllten: $\log_2$ FC ≥ 2 und $P \leq 0.05$. In Zellen, welche in Abwesenheit von Serum kultiviert wurden, wurden durch die L-HPG-Behandlung der Zellen 155 Proteine mindestens vierfach ($\log_2$ FC ≥ 2) gegenüber den Methionin-behandelten Zellen signifikant ($P \leq 0.05$) angereichert. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-1 stimuliert, wurden 398 signifikant angereicherte Proteine identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden bei Serum-Anwesenheit

lediglich 8 Proteine signifikant und mindestens vierfach angereichert. Wurden die mit Serum-kultivierten Zellen zusätzlich für 6 h mit IL-1 stimuliert, konnten 717 Proteine mit einer signifikanten Anreicherung nach der L-HPG Markierung von neu-synthetisierten Proteinen identifiziert werden. Dies bestätigte, dass die IL-1 Stimulation einen großen Einfluss auf das naszierende Sekretom hatte, wenn die Zellen mit Serum kultiviert wurden. Wurden die Zellen ohne FBS kultiviert, war der Effekt der IL-1 Stimulation geringer. Es wurden bereits viele Proteine ohne IL-1 Stimulation, aber unter Hungerstressbedingungen sekretiert.

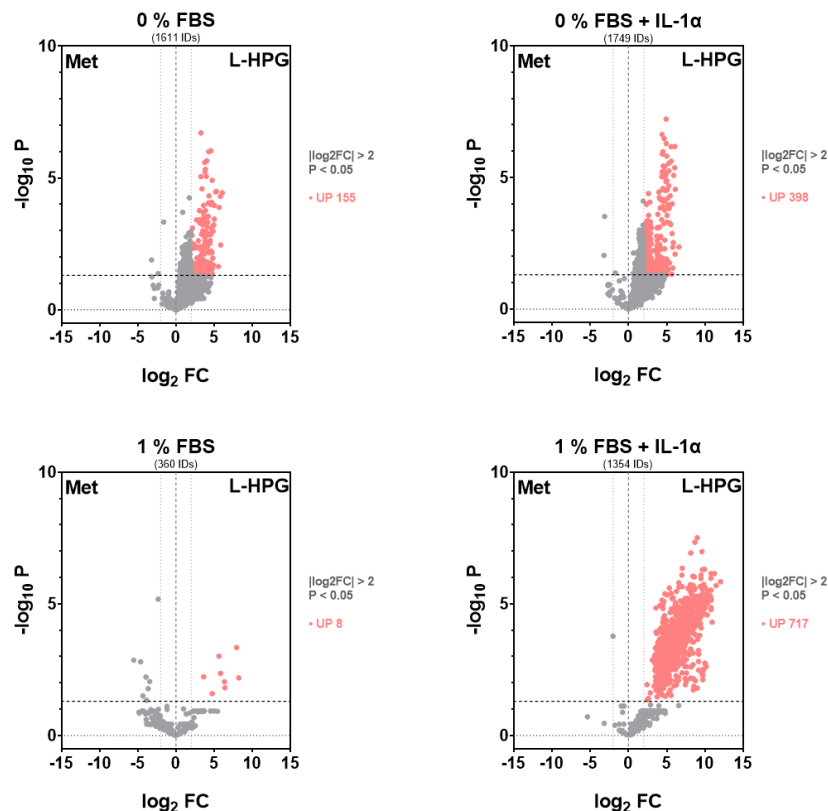


Abb. 4.67 Anreicherung mittels LC-MS/MS identifizierter Proteine nach erfolgreicher L-HPG Markierung.

HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 µM] behandelt oder Methionin [25 µM] wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die präzipitierten Proteine aus den Zellkulturüberständen wurden über die KLINK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierte Proteinfraction wurde über Streptavidin-Beads aufgereinigt und über LC-MS/MS analysiert. Vulkanplots zum Einfluss der L-HPG Markierung sind dargestellt. 93 Proteine, welche von Perseus als Kontaminanten klassifiziert wurden, wurden dabei aus der Analyse ausgeschlossen. Aufgetragen wurde der $\log_2$ FC gegen $-\log_{10} P$. Der Vergleich wurde dabei jeweils zu Zellen, welche mit L-Methionin behandelt wurden, gezogen. Proteine, welche folgende Kriterien erfüllten, sind in Rot dargestellt: $\log_2$ FC ≥ 2 und $P \leq 0.05$. Die Signifikanzanalyse wurde über den Student's T-Test durchgeführt.

Venn-Analysen der Proteine, welche durch die L-HPG Markierung mindestens vierfach ($\log_2$ FC ≥ 2) und signifikant ($P \leq 0.05$) im Vergleich zu Methionin behandelten Zellen angereichert wurden, zeigten, dass die Mehrheit der neu-synthetisierten und sekretierten Proteine spezifisch durch die IL-1 Stimulation induziert wurden (Abb. 4.68 A). 265 IDs wurden lediglich angereichert, wenn die Zellen ohne Serum kultiviert und mit IL-1 stimuliert wurden. Wurden die Zellen hingegen in Anwesenheit von Serum kultiviert und mit IL-1 stimuliert,

wurden 583 Proteine individuell angereichert. 83 Proteine wurden sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von Serum nach erfolgter IL-1 Stimulation angereichert. Kein Protein zeigte eine Anreicherung unter allen Bedingungen.

Eine detaillierte Anreicherungsanalyse über Metascape wurde zusätzlich durchgeführt (Zhou et al., 2019), um Prozesse zu identifizieren, in denen die sekretierten Proteine eine Rolle spielten. Für die Analyse wurden die Proteine einbezogen, welche mindestens vierfach und signifikant angereichert wurden, wenn die Zellen mit L-HPG behandelt wurden ($\log_2 \text{FC} \geq 2$ und $P \leq 0.05$). Der Vergleich wurde dabei auf die jeweils Methionin-behandelten Zellen gezogen. Die TOP 20 angereicherten Prozesse sind in Abb. 4.68 B dargestellt. Des Weiteren wurden Prozesse hinzugefügt, welche von besonderem Interesse waren. Die Anreicherungsanalyse zeigte erneut, dass sich hauptsächlich zytosolische Prozesse unter den TOP 20 angereicherten Prozessen befanden. Dazu gehörten Prozesse wie beispielsweise *protein folding* (GO:0006457), *ribosome biogenesis* (GO:0042254), *RNA localization* (GO:0006403), *cell cycle* (R-HSA-1640170) oder *metabolism of RNA* (R-HSA-8953854). Allerdings wurden diese Prozesse nicht angereichert, wenn die Zellen in Anwesenheit von Serum kultiviert wurden und unstimuliert blieben. In Serum-kultivierten Zellen wurde lediglich der Prozess *neutrophil degranulation* (R-HSA-6798695) angereichert. Hier flossen aber nur 8 Proteine in die Analyse ein (Abb. 4.67). Wurden die Zellen (1 % FBS) zusätzlich mit IL-1 stimuliert, so wurden die TOP20 Prozesse stark angereichert. Wurden die Zellen hingegen in Abwesenheit von Serum kultiviert, so wurden diese Prozesse sowohl basal als auch nach der IL-1 Stimulation angereichert. Lediglich die Prozesse *chromosome organization* (GO:0051276), *regulation of DNA metabolic process* (GO:0051052), *regulation of translation* (GO:0006417), *neutrophil degranulation* (R-HSA-6798695) wurden nur dann signifikant angereichert, wenn die gehungerten Zellen zusätzlich mit IL-1 stimuliert wurden. Zusätzlich zu den TOP 20 angereicherten Prozessen wurden die Anreicherungen weiterer Prozesse dargestellt. Dazu gehörten die Prozesse *cellular response to stress* (R-HSA-2262752) und *apoptosis* (R-HSA-109081). Proteine, welche eine Rolle bei diesen Prozessen spielten, wurden signifikant angereichert, wenn die Zellen ohne Serum kultiviert wurden (sowohl ohne als auch mit IL-1). Auch in Anwesenheit von FBS und nach der IL-1 Stimulation wurden diese Prozesse angereichert. Die Prozesse *cytokine signaling in immune system* (R-HSA-1280215) und *cellular response to cytokine stimulus* (GO:0071345) wurden hingegen lediglich angereichert, wenn die Zellen mit IL-1 stimuliert wurde. Dies war unabhängig von der Anwesenheit bzw. der Abwesenheit von Serum. Im Gegensatz wurden die Prozesse *signaling by interleukins* (R-HSA-449147) und *interleukin-1 family signaling* (R-HSA-446652) nur bei Anwesenheit von Serum und nach erfolgter IL-1 Stimulation angereichert. Insgesamt wurden in der Analyse nur vier Zytokine detektiert: CXCL3, IL36G, IL1RL1 und IL1RN.

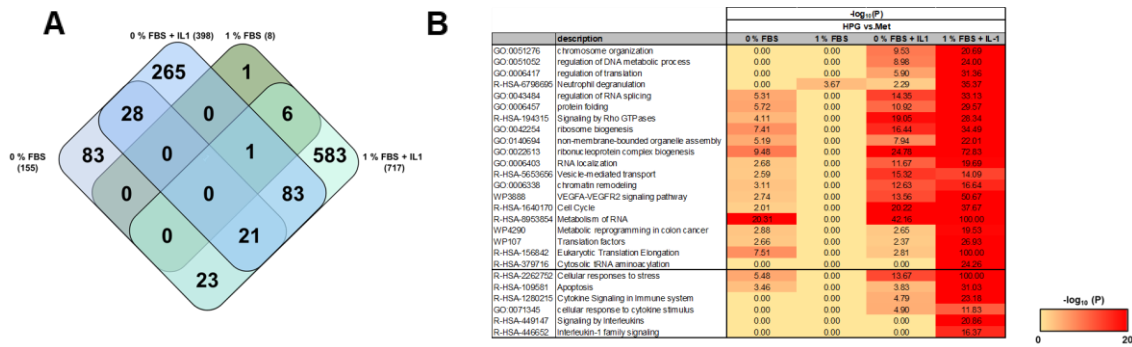


Abb. 4.68 Anreicherungsanalyse der durch L-HPG angereicherten IDs im Sekretom von HCT116 Zellen.

HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 μ M] behandelt oder Methionin [25 μ M] wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die präzipitierten Proteine aus den Zellkulturüberständen wurden über die KLICK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierte Proteinfraktion wurde über Streptavidin-Beads aufgereinigt und über LC-MS/MS analysiert. (A) Venn-Analysen von IDs, welche durch L-HPG im Vergleich zu Methionin-behandelten Zellen angereichert wurden, wurden durchgeführt. Die IDs mussten folgende Kriterien erfüllen: $\log_2$ FC ≥ 2 und $P \leq 0.05$. (B) Überrepräsentationsanalysen von IDs, welche durch L-HPG im Vergleich zu Methionin-behandelten Zellen angereichert wurden, wurden mittels Metascape durchgeführt. Die IDs mussten folgende Kriterien erfüllen: $\log_2$ FC ≥ 2 und $P \leq 0.05$. In der *heatmap* wurde $-\log_{10} P$ der TOP 20 angereicherten Prozesse dargestellt. Außerdem wurden im unteren Bereich weitere interessante Prozesse hinzugefügt.

Um den Einfluss der IL-1 Stimulation auf das L-HPG-markierte Sekretom genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich quantitative Analysen basierend auf den Proteinanreicherungen in IL-1 stimulierten Zellen gegenüber den unstimulierten Zellen durchgeführt. Diese Analyse diente auch einer erneuten Kontrolle der erfolgreichen L-HPG Markierung und der Aufreinigung biotinylierter Proteine. Vulkanplots (Abb. 4.69) demonstrierten die (signifikanten) Anreicherungen von Proteinen in IL-1 stimulierten Zellen. Es wurden jeweils der $\log_2$ FC gegen den $-\log_{10}(P)$ aufgetragen. Der Vergleich wurde jeweils zu den unstimulierten Zellen gezogen. Näher betrachtet wurden anschließend IDs, welche folgende Bedingungen erfüllten: $\log_2$ FC ≥ 2 und $P \leq 0.05$. Wurden die Zellen als Kontrolle mit Methionin behandelt, wurden 212 Proteine mindestens vierfach ($\log_2$ FC ≥ 2) und signifikant ($p \leq 0.05$) durch die IL-1 Stimulation angereichert, wenn die Zellen in Abwesenheit von Serum kultiviert wurden. Erfolgte hingegen die metabolische Markierung der Zellen mittels L-HPG, wurden 762 biotinylierte Proteine durch die IL-1 Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen angereichert. Wurden die Zellen im Gegensatz mit 1 % FBS kultiviert und mit Methionin behandelt, wurden lediglich 2 IDs mindestens vierfach angereichert, wenn die Zellen mit IL-1 stimuliert wurden. Die Markierung der neu-synthetisierten Proteine mit L-HPG sorgte für eine Anreicherung von 701 IL-1 induzierten Proteinen im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Proteine vermehrt durch die IL-1 Stimulation angereichert wurden, wenn die Zellen mit L-HPG behandelt wurden. Diese Proteine konnten über die KLICK Reaktion mit Biotin konjugiert und über Streptavidin-Beads aufgereinigt werden. Wurden die Zellen hingegen mit Methionin behandelt, wurde nur ein kleiner Teil dieser

Proteine angereichert. Dies zeigte erneut, dass die Methode zur Identifizierung neu-synthetisierter Proteine in Zellkulturüberständen erfolgreich war.

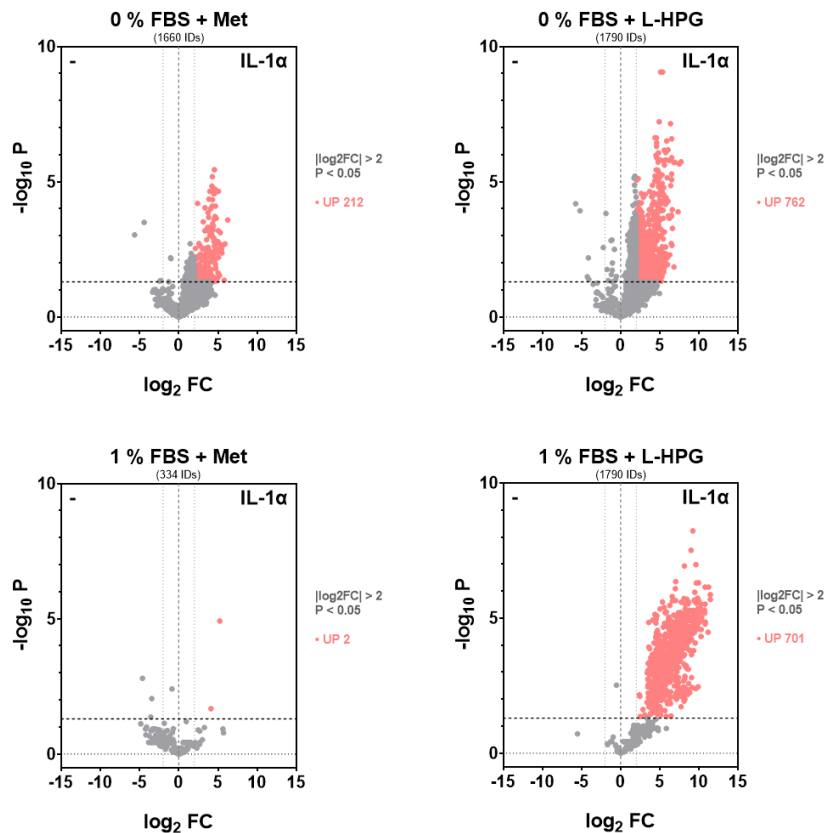


Abb. 4.69 Anreicherung mittels LC-MS/MS identifizierter Proteine nach erfolgter IL-1 Stimulation.

HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 μ M] behandelt oder Methionin [25 μ M] wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die präzipitierten Proteine aus den Zellkulturüberständen wurden über die KLINK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierte Proteinfraction wurde über Streptavidin-Beads aufgereinigt und über LC-MS/MS analysiert. Vulkanplots zum Einfluss der IL-1 Stimulation sind dargestellt. 93 Proteine, welche von Perseus als Kontaminanten klassifiziert wurden, wurden dabei aus der Analyse ausgeschlossen. Aufgetragen wurde der $\log_2 FC$ gegen $-\log_{10} P$. Der Vergleich wurde dabei jeweils zu Zellen, welche nicht stimuliert wurden, gezogen. Proteine, welche folgende Kriterien erfüllten, sind in Rot dargestellt: $\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$. Die Signifikanzanalyse wurde über den Student's T-Test durchgeführt.

Proteine, welche nach erfolgter IL-1 Stimulation mindestens vierfach ($\log_2 FC \geq 2$) und signifikant ($p \leq 0.05$) im Vergleich zu unstimulierten Zellen angereichert wurden, wurden genauer betrachtet. Zum einen wurden Venn-Diagramme (Abb. 4.70 A) der IDs erstellt, welche die Kriterien erfüllten. Die Analyse zeigte, dass die Mehrheit der Proteine individuell durch die L-HPG Markierung der Zellen angereichert wurden. 414 Proteine wurden nach erfolgter IL-1 Stimulation nur dann angereichert, wenn die Zellen in Abwesenheit von Serum mit L-HPG behandelt wurden. Hingegen wurden 420 Proteine in Anwesenheit von Serum angereichert. Des Weiteren wurden 205 Proteine sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Serum durch die IL-1 Stimulation angereichert, wenn die Zellen mit L-HPG behandelt wurden. Zum anderen wurden Anreicherungsanalysen mittels Metascape durchgeführt, um Prozesse zu identifizieren, in denen die sekretierten Proteine eine Rolle spielten. In die Analyse wurden

ebenfalls die IDs einbezogen, welche mindestens vierfach und signifikant durch die IL-1 Stimulation angereichert wurden. Die 2 IDs, welche in Anwesenheit von Serum und nach erfolgter Methionin-Behandlung der Zellen durch IL-1 angereichert wurden (Abb. 4.69), wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt. Unter den TOP20 angereicherten Prozessen (Abb. 4.70 B) befanden sich erneut überwiegend intrazelluläre Prozesse. Beispielsweise wurden Prozesse wie *metabolic reprogramming in colon cancer* (WP4290), *protein folding* (GO:0006457), *cell cycle* (R-HSA-1640170) und *metabolism of RNA* (R-HSA-8953854) angereichert. Diese Prozesse wurden unter allen einbezogenen Bedingungen angereichert. Lediglich die Prozesse *cytosolic tRNA aminoacylation* (R-HSA-379716) und *neutrophil degranulation* (R-HSA-6798695) wurden nur angereichert, wenn die Zellen mit L-HPG behandelt wurden. Insgesamt fielen die Signifikanzen ($-\log_{10} P$) geringer aus, wenn die Zellen mit Methionin behandelt wurden. Zusätzlich zu den TOP20 Prozessen, wurden für die Analyse weitere Prozesse von Bedeutung näher betrachtet (Abb. 4.70). Die Prozesse *cellular responses to stress* (R-HSA-2262752) und *apoptosis* (R-HSA-109581) wurden unter allen betrachteten Bedingungen angereichert. Prozesse, welche ausschließlich durch die IL-1 Stimulation angereichert wurden, wenn die Zellen zusätzlich mit L-HPG behandelt wurden, waren *signaling by interleukins* (R-HSA-449147), *interleukin-1 signaling* (R-HSA-9020702), *interleukin-1 family signaling* (R-HSA-446652), *cellular response to cytokine stimulus* (GO:0071345) und *cytokine signaling in immune system* (R-HSA-1280215). Zusammenfassend zeigten diese Daten nicht nur die erfolgreiche Etablierung einer Methode zur spezifischen Aufreinigung von neu-synthetisierten und sekretierten Proteinen, welche mit Biotin konjugiert wurden, sondern auch eine interessante differentielle Serum- und IL-1 abhängige Modulation des mit diesem Verfahren messbaren Sekretoms.

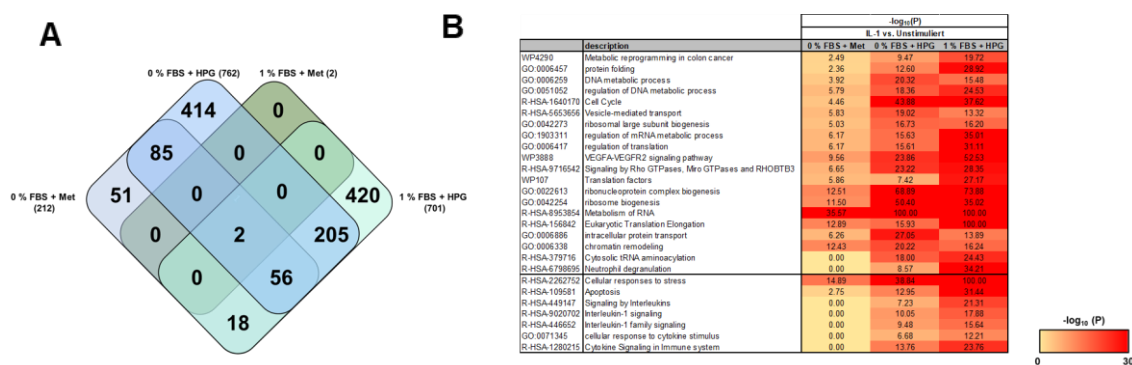


Abb. 4.70 Anreicherungsanalyse der durch IL-1 angereicherten IDs im Sekretom von HCT116 Zellen.

HCT116 Zellen wurden für 6 h in Methionin-freiem Medium, welches 0 % FBS oder 1 % FBS enthielt, kultiviert. Während dieser 6 h wurden die Zellen mit L-HPG [25 µM] behandelt oder Methionin [25 µM] wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen für 6 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die präzipitierten Proteine aus den Zellkulturüberständen wurden über die KLICK Reaktion biotinyliert. Die biotinylierte Proteinfraction wurde über Streptavidin-Beads aufgereinigt und über LC-MS/MS analysiert. (A) Venn-Analysen von IDs, welche durch IL-1 im Vergleich zu unstimulierten Zellen angereichert wurden, wurden durchgeführt. Die IDs mussten folgende Kriterien erfüllen: $\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$. (B) Überrepräsentationsanalysen von IDs, welche durch IL-1 im Vergleich zu unstimulierten Zellen angereichert wurden, wurden mittels Metascape durchgeführt. Die IDs mussten folgende Kriterien erfüllen: $\log_2 FC \geq 2$ und $P \leq 0.05$. In der heatmap wurde $-\log_{10} P$ der TOP 20 angereicherten Prozesse dargestellt. Außerdem wurden im unteren Teil der Tabelle weitere interessante Prozesse hinzugefügt.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von Cyclin-abhängigen Kinasen im IL-1 Signalweg

Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) spielen, wie in der Einleitung beschrieben, eine entscheidende Rolle sowohl im Zellzyklus als auch bei der Genexpression und somit auch für die Proliferation von Zellen. Aufgrund ihrer zentralen Rolle in diesen wichtigen Prozessen wurden und werden fortlaufend verschiedene CDK Inhibitoren entwickelt und als anti-proliferative bzw. pro-apoptotische Wirkstoffe für die Behandlung von Tumorerkrankungen getestet. So wurden die spezifischen CDK4/6 Inhibitoren Palbociclib, Abemaciclib und Ribociclib, welche den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus blockieren und damit das Tumorstadium verzögern können, bereits für die Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation befinden sich eine Reihe weiterer CDK Inhibitoren in verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung zur zielgerichteten Behandlung unterschiedlicher Tumorerkrankungen (Panagiotou et al., 2022; Zhang et al., 2021b).

Wie die CDKs spielt auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zentrale Rolle in der Entstehung und bei der Progression von Tumoren. NF- κ B fördert insbesondere die Bildung eines tumorfördernden, pro-inflammatorischen Tumormikromilieus, welches durch Zytokine wie Interleukin-1 initiiert und propagiert wird (DiDonato et al., 2012; Rebe and Ghiringhelli, 2020; Riedlinger et al., 2018; Xia et al., 2018).

In dieser Arbeit sollte das Zusammenspiel zwischen der IL-1-NF- κ B vermittelten Entzündung und CDKs untersucht werden. Hierzu wurde der Einfluss von verschiedenen CDK Inhibitoren auf die IL-1-NF- κ B gesteuerte Signaltransduktion, Genexpression und Proteinsekretion vergleichend und systematisch in vier Tumorzelllinien (HeLa, HCT116, OVCAR-4, iFTSECs+mutKRAS/Myc) untersucht. Aufgrund von Vorbefunden zu einer post-translationalen Regulation von CDK12/13 im IL-1 System und einer erhöhten Mutationsrate in malignen Tumoren, wurde ein spezieller Fokus auf die RNA-Polymerase II und Elongations-assoziierten CDK12/13 gelegt. Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, die zellulären, pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Phänotypen von neuen CDK12/13 Inhibitoren zu bestimmen und parallel dazu ein genetisches Degron System zu etablieren, um diese Kinasen gezielt und spezifisch in intakten Zellen zu degradieren. Die erzielten, im Folgenden ausführlich beschriebenen, Befunde zeigen, dass alle Ansätze CDK12 (und CDK13) effektiv inhibieren, sich aber deutlich hinsichtlich differentieller Effekte auf die IL-1 vermittelte Signaltransduktion, Genexpression und Proteinsekretion unterscheiden. Diese Beobachtungen haben weitreichende Konsequenzen für zukünftige Experimente zur mechanistischen Aufklärung der Rolle von CDK12/13 und für (prä)klinische Anwendungen von modernen CDK Inhibitoren.

5.1.1 Der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol supprimiert die IL-1 vermittelte Genexpression und Proteinsekretion

Flavopiridol (oder auch Alvociclib) ist ein halb-synthetisches Flavoalkaloid. Es handelt sich dabei um ein Derivat des pflanzlichen Alkaloids Rohitukin aus *Amoora rohituka* (Harmon and Weiss, 1979). Entdeckt wurde Flavopiridol als natürliches Produkt, welches die Phosphorylierung von EGFR (*epidermal growth factor receptor*) inhibiert (Newcomb, 2004). Später wurde Flavopiridol als pan-CDK Inhibitor identifiziert, welcher sowohl Zellzyklus-assoziierte CDKs (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6) als auch transkriptionelle CDKs (CDK7, CDK9) inhibiert. Auch CDK12 wird durch Flavopiridol inhibiert. Allerdings werden im Vergleich zur CDK9 Inhibition 5 bis 10-fach höhere Konzentrationen benötigt (Bartkowiak and Greenleaf, 2015; Bosken et al., 2014). Flavopiridol ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor, welcher direkt mit der ATP-Bindestelle der Kinasen interagiert (Filgueira de Azevedo et al., 1996; Sedlacek et al., 1996). Die Inhibition von CDK9, welche eine Untereinheit des Transkriptionelongationsfaktors p-TEFb ist, führt zu einer Blockade der mRNA Synthese (Baumli et al., 2008; Chao and Price, 2001; Chen et al., 2005). Des Weiteren inhibiert Flavopiridol CDKs, welche für die Progression des Zellzyklus von Bedeutung sind. Bereits in 1992 wurde gezeigt, dass Flavopiridol einen Zellzyklus-Arrest in verschiedenen Brust- und Lungenkrebs-Zelllinien induziert (Kaur et al., 1992). Grund hierfür ist sowohl die direkte Inhibition der Zellzyklus-assoziierten und transkriptionellen CDKs als auch die Reduzierung der Phosphorylierung der Aktivierungsschleife der CDKs durch die Inhibition von CDK7 (Gallorini et al., 2012). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Flavopiridol als anti-proliferativer Wirkstoff evaluiert, welcher zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase oder der G2-Phase führt und die Apoptose in vielen verschiedenen Krebszelllinien induziert. Prä-klinische Studien zeigten, dass die Behandlung von Tumoren mit Flavopiridol *in vitro* effektiv wirkt. Außerdem supprimiert Flavopiridol das Tumorwachstum in tumor-erkrankten Mäusen *in vivo* (Arguello et al., 1998; Blagosklonny, 2004; Kelland, 2000; Parker et al., 1998; Patel et al., 1998; Sedlacek, 2001). Flavopiridol war der erste CDK Inhibitor, welcher in klinischen Studien getestet wurde, insbesondere bei der Behandlung von Leukämien (Kelland, 2000; Senderowicz, 1999). Insgesamt wurden 67 klinische Studien der Phasen I und II mit Flavopiridol durchgeführt (www.clinicaltrials.gov, Stand 13.09.2023). Flavopiridol wurde sowohl als Einzeltherapie als auch in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika getestet. Aufgrund fehlender klinischer Wirksamkeit in Kombination mit dosis-limitierender Toxizität wurden bisher keine Phase III Studien durchgeführt. Es kam zu Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Ermüdung, Erbrechen, Leberfunktionsstörungen, Neutropenie und Thrombose, was vereinbar wäre mit den sehr globalen zellulären Effekten von Flavopiridol, die in dieser Arbeit beobachtet wurden (Kelland, 2000; Senderowicz, 1999; Zhai et al., 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse fiel der Fokus schließlich eher auf spezifischere CDK Inhibitoren wie beispielsweise die selektiven

CDK4/6 Inhibitoren Palbociclib, Abemaciclib und Ribociclib (Blagosklonny, 2004; Gallorini et al., 2012; Murphy and Dickler, 2015; Newcomb, 2004).

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass die Behandlung von verschiedenen immortalisierten oder transformierten Zelllinien (HCT116, HeLa, OVCAR4, iFTSECs, iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc) mit Flavopiridol zu einer reduzierten Phosphorylierung von Retinoblastom (Rb) führte. Diese Phosphorylierung ist notwendig für den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und wird von CDK4/6 katalysiert. Die reduzierte Phosphorylierung deutete somit auf eine erfolgte Inhibition von CDK4 und CDK6 hin. Zudem war die Phosphorylierung von Ser2 und Ser5 der CTD von RNA-Polymerase II reduziert. Die Inhibition von CDK7 und CDK9 durch Flavopiridol führt somit im basalen Zustand offenbar zu einer verringerten Phosphorylierung der CTD und zu einer Modulation der mRNA Synthese.

Alle verwendeten Tumor- und Kontrollzelllinien zeigten eine starke und reproduzierbare IL-1 Responsivität auf der Ebene der Signaltransduktion und die Untersuchung der Effekte von Flavopiridol auf die IL-1 Antwort konnte somit vergleichend durchgeführt werden. In allen Zelllinien erfolgte innerhalb von 0.5 h die IL-1-vermittelte Degradation von I κ B α gefolgt von der (NF- κ B vermittelten) Re-Synthese nach 1 h IL-1 Behandlung. Flavopiridol hemmte die IL-1 induzierte Re-Synthese von I κ B α in allen Zelllinien vollständig. Auch die IL-1 induzierte Synthese von A20, einem weiteren negativen *feedback* Inhibitor von NF- κ B, wurde blockiert. Die Western Blot Analysen zeigten außerdem, dass die IL-1 induzierte Phosphorylierung von p65 reduziert war, wenn die Zellen für 17 h mit Flavopiridol behandelt wurden. Eine 4-stündige Behandlung zeigte wiederum keinen Effekt auf die p65-Phosphorylierung.

Flavopiridol suppressierte die IL-1 vermittelte Genexpression von ausgewählten inflammatorischen Genen in allen verwendeten Zelllinien vollständig und eine RNASeq Analyse zeigte, dass Flavopiridol die IL-1 induzierte Genexpression global inhibiert. In iFTSECs+Leervektor wurden nach 3 h IL-1 Stimulation insgesamt 1429 Gene mindestens vierfach im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle herunterreguliert, während in iFTSECs+mutKRAS/Myc die Genexpression von 1450 Genen mindestens vierfach supprimiert wurde. Die Suppression war somit unabhängig von den onkogenen, genetischen Veränderungen der Zellen. Anreicherungsanalysen der differentiell exprimierten Gene über das Softwaretool Metascape zeigten, dass vor allem Gene aus inflammatorischen Prozessen supprimiert wurden. Es war bereits bekannt, dass Flavopiridol die Aktivierung von NF- κ B und die NF- κ B regulierte Genexpression inhibiert und damit die Entzündungsreaktion supprimiert (Takada and Aggarwal, 2004). Dass die Inhibition von transkriptionellen CDKs (speziell CDK9) anti-inflammatorische Effekte hat, konnte ebenfalls bereits mehrfach gezeigt werden (Henry et al., 2018; Krystof et al., 2012). Vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass Palbociclib, ein selektiver CDK4/6 Inhibitor, die IL-1 induzierte Genexpression von *IL8*

ebenfalls unterdrückt. Zudem wurde gezeigt, dass CDK6 mit der NF- κ B Untereinheit p65 ko-lokalisiert und diese an Ser536 phosphoryliert. CDK6 fördert zudem die Rekrutierung von p65 zum *IL8* Locus (Buss et al., 2012; Handschick et al., 2014). Somit werden die Flavopiridol Effekte am ehesten durch eine Kombination aus der Blockade der mRNA Synthese (durch die Inhibition von CDK7 und CDK9) und der reduzierten Rekrutierung von p65 an entsprechende genomische Loci (durch CDK6 Inhibition) erklärt.

Zudem zeigten Sekretomanalysen mittels ELISA, dass die Sekretion ausgewählter Chemokine vollends unterdrückt wurde. Auch sekretomweite Analysen mittels Olink Technologie bestätigten den supprimierenden Effekt von Flavopiridol auf die IL-1 induzierte Sekretion von Zytokinen und weiteren inflammatorischen Proteinen. Somit wurde die supprimierende Wirkung von Flavopiridol auf die NF- κ B Zielgene auch auf der Proteinebene nachgewiesen. Viele Proteine, welche in der Olink Analyse durch Flavopiridol vermindert sekretiert wurden, wurden bereits in der RNASeq als suppressierte Gene identifiziert, obwohl Transkriptom- und Sekretomanalyse zeitlich versetzt durchgeführt wurden, um der Zeit, die für die Proteinsekretion benötigt wird, Rechnung zu tragen.

Des Weiteren zeigten diese Daten, dass die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol zu einer verstärkten Freisetzung vieler weiterer IL-1 unabhängiger Proteine führte. Diese Proteine waren überwiegend an intrazellulären Prozessen wie z.B. dem Zellzyklus oder metabolischen Prozessen beteiligt. Die Genexpression jener Gene, welche für diese Proteine codieren, wurde hingegen nicht beeinflusst. Dies ließ darauf schließen, dass diese Proteine von apoptotischen Zellen freigesetzt wurden, welche eventuell durch die Behandlung starben und ihre Proteine in den Zellkulturüberstand abgaben. Dies zeigte, dass Sekretomanalysen generell komplex zu interpretieren sind, wenn Substanzen oder Bedingungen untersucht werden, welche Zelltod induzieren.

Die Ergebnisse offenbarten insgesamt einen ausgeprägten supprimierenden Effekt von Flavopiridol auf die IL-1 gesteuerte Genexpression und die Expression bzw. Sekretion vieler Proteine. Dies untermauert die Annahme, dass Flavopiridol anti-inflammatorische und tumor-supprimierende Funktionen besitzt.

5.1.2 THZ531 hat einen differentiellen Effekt auf verschiedene IL-1 induzierte Gene
CDK12 und CDK13 sind Elongations-assoziierte Kinasen, welche hauptsächlich Ser2 der CTD von RNA-Polymerase II während der transkriptionellen Elongation phosphorylieren (Bartkowiak et al., 2010; Greenleaf, 2019). THZ531 ist ein selektiver Inhibitor für CDK12 und CDK13. Es handelt sich hierbei um einen kovalenten und somit irreversiblen Inhibitor, welcher an ein Cystein nahe der ATP-Bindestelle von CDK12 und CDK13 bindet. Der IC_{50} für die Inhibition von CDK12 und CDK13 beträgt *in vitro* 158 nM bzw. 69 nM. Auch CDK7 und CDK9

werden durch THZ531 inhibiert. Allerdings fällt die Inhibition mit einem IC_{50} von 8.5 μ M bzw. 10.5 μ M mehr als 50-fach schwächer aus (Zhang et al., 2016). Die Inhibition von CDK12/13 hat eine frühzeitige Termination der Transkription an intronischen Polyadenylierungsstellen (IPA) zur Folge. Dabei sind vor allem lange Gene betroffen, welche mehrere IPAs besitzen. Die Genlänge korreliert dabei mit der Herunterregulation der Expression des jeweiligen Gens. Aufgrund der Inhibition von CDK12/13 führt die Behandlung mit THZ531 vor allem zu einer verringerten Expression von DNA-Reparaturgenen und Replikationsgenen. Die blockierte Expression der DNA-Reparaturgene (wie beispielsweise *BRCA1* und *BRCA2*) hat eine Genominstabilität zur Folge. THZ531 reduziert die Zellproliferation bzw. induziert den Zellzyklus-Arrest in der G2/M Phase. Außerdem hat THZ531 pro-apoptotische Wirkungen (Fan et al., 2020; Krajewska et al., 2019; Zhang et al., 2016). Unter Verwendung des ATP-kompetitiven CDK12/13 Inhibitors SR-4835 konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Dieser Inhibitor induziert ebenfalls den Zelltod in Brustkrebs-Zelllinien und wirkt in Synergie mit PARP-Inhibitoren (Quereda et al., 2019). Auch *in vivo* Experimente zeigten, dass der duale, ebenfalls kovalente CDK12/13 Inhibitor ZSQ836 das Tumorstadium verringert. Die abdominale Masse und das Tumorgewicht eines Ovarialkarzinoms nimmt in Xenograft-Modellen nach der Behandlung mit ZSQ836 ab. Die Zellproliferation der Krebszellen wird verringert und die Anzahl an apoptotischen Zellen nimmt zu (Cheng et al., 2022). Somit sind auch spezifische CDK12/13 Inhibitoren potentielle anti-proliferative und pro-apoptotische Mittel für die Behandlung von Tumorerkrankungen. Besonders im Ovarialkarzinom spielt *CDK12* eine bedeutsame Rolle, da es sich hierbei um eines der 10 am häufigsten mutierten Gene handelt (Cancer Genome Atlas Research, 2011). In einer ersten klinischen Studie werden HGSOC-Organoiden aus erkrankten Patienten mit THZ531 behandelt. Der Inhibitor wird als Einzeltherapie oder als Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika getestet. Die Ergebnisse der Studie stehen noch aus (Stand 13.09.2023) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04555473?term=THZ531&draw=2&rank=1>).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass THZ531 die Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) zeit- und dosisabhängig in HCT116 und HeLa Zellen induziert. PARP ist involviert in die Reparatur von DNA-Schäden und eine Spaltung von PARP ist ein Hinweis auf Apoptose (Oliver et al., 1998). Somit konnte in Übereinstimmung mit der Literatur gezeigt werden, dass THZ531 Apoptose induziert. Des Weiteren induziert THZ531 zeit- und dosisabhängig die Phosphorylierung der Histon H2A Variante H2AX (γ H2AX). H2AX wird bei auftretenden Doppelstrangbrüchen phosphoryliert und dient daher als Marker für DNA-Schäden (Burma et al., 2001). Analoge Befunde wurden bereits von weiteren Arbeitsgruppen berichtet und verdeutlichen das Potential von THZ531 als anti-proliferativer und pro-apoptotischer Wirkstoff (Krajewska et al., 2019; Zhang et al., 2016). Zusätzlich zeigten die Ergebnisse der Arbeit, dass eine längere Behandlung mit 1 μ M THZ531 (17 h) zu einer

verringerten Phosphorylierung von Rb in den Krebszellen führte. Dies bestätigte erneut einen Effekt von THZ531 auf die Proliferation. In den iFTSECs und iFTSECs+Leervektor hatte THZ531 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rb.

Die Behandlung aller verwendeten Zelllinien mit 1 μ M THZ531 führte zu einer verringerten Phosphorylierung von Ser2 der CTD. Dafür reichte bereits eine Inkubationszeit von 1 h aus. Die Phosphorylierung von Ser2 der CTD spielt eine wichtige Rolle bei der Elongation der Transkription (Buratowski, 2003; Egloff and Murphy, 2008; Harlen and Churchman, 2017). Elongationsfaktoren und Spleißfaktoren werden nach dem CTD-Code über die simultane Phosphorylierung von Ser2 und Ser5 rekrutiert. Entlang des Gens wird Ser5 dephosphoryliert. Ist am Ende des Gens lediglich Ser2 phosphoryliert, können Polyadenylierungs- und Terminationsfaktoren rekrutiert werden. Somit spielen die Ser2-Phosphorylierung und schlussfolgernd CDK12/13 eine wichtige Rolle bei der Elongation und Termination der Transkription (Ahn et al., 2004; Buratowski, 2003; Komarnitsky et al., 2000). THZ531 beeinflusst somit wichtige Regulationsprozesse der Genexpression.

Um den Einfluss von THZ531 auf den IL-1-NF- κ B Signalweg zu untersuchen, wurden die verschiedenen Zellen nach 1 h Vorbehandlung mit THZ531 zusätzlich mit IL-1 stimuliert. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse waren konsistent für alle Zelllinien. Western Blot Analysen zeigten, dass I κ B α in allen Zelllinien nach 0.5 h IL-1 Stimulation abgebaut wird. Dies erlaubt die Translokation von p65 in den Zellkern und die Aktivierung der NF- κ B Zielgene. Die (p65 NF- κ B abhängige) Re-Synthese des *NFKBIA* Transkripts tritt wie beschrieben bereits direkt nach der zytoplasmatischen Degradation von I κ B α ein. Nach 3 h IL-1 steigt die Menge des neu-translatierten I κ B α im Zytosol wieder auf das Ausgangsniveau (vor der IL-1 Stimulation) und segregiert p65 NF- κ B wieder im Zytosol. Außerdem kompetitiert nukleares I κ B α mit p65 an den Promotoren der NF- κ B-abhängigen Gene. Die Kombination dieser Mechanismen und negativen *feedback loops* sorgen für die schnelle, starke und zeitlich begrenzte Aktivierung der NF- κ B Zielgene (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Prescott et al., 2021; Sun et al., 1993). Wurden die Zellen mit THZ531 behandelt, war die Re-Synthese von I κ B α deutlich verringert bzw. verlangsamt. Auch die IL-1 induzierte Synthese von TNFAIP3/A20, eines weiteren Inhibitors von NF- κ B, wurde herunterreguliert. THZ531 verlangsamt somit die Synthese der zwei potentesten, zytosolischen NF- κ B Inhibitoren. Der negative Regelkreis des Signalwegs wird beeinflusst. Dieser bedeutsame Effekt könnte in Zukunft mit unabhängigen Methoden validiert und hinsichtlich seiner funktionellen Bedeutung in komplexeren (auch präklinischen) Modellsystemen weiter untersucht werden.

Genexpressionsanalysen ausgewählter IL-1 Zielgene mittels RT-qPCR zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit THZ531 zu einer erhöhten Expression einiger Gene (z.B. *IL8*, *CXCL2*, *CCL20*) nach 3 h IL-1 Stimulation führte. Besonders die Expression von *CXCL2* wurde

in allen verwendeten Zelllinien stark induziert. Die verringerte Synthese von I κ B α und A20 hat einen Einfluss auf die NF- κ B Aktivierung. NF- κ B ist für einen längeren Zeitraum aktiviert und die Expression der Zielgene dadurch gesteigert. Auch die Expression von *NFKBIA*, codierend für I κ B α , war nach 3 h IL-1 Stimulation in allen Zelllinien erhöht. Nach 0.5 h und 1 h IL-1 Stimulation konnte allerdings eine leichte Abnahme der mRNA Menge im Vergleich zu DMSO behandelten Kontrollen beobachtet werden. Dies untermauerte die Vermutung, dass die Synthese von I κ B α lediglich verlangsamt und nicht gänzlich unterdrückt ist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die veränderte Phosphorylierung der CTD, was eine ineffizientere und verlangsamte Genexpression zur Folge haben kann. Chirackal Manavalan et al., zeigten bereits, dass die Inhibition von CDK12 zur Akkumulation bzw. Verschiebung von pSer2 ChIPSeq-Signalen vom 3' Ende zur Genmitte führt. Dies deckt sich mit einer langsameren Transkriptionsrate in den Genkörpern (Chirackal Manavalan et al., 2019; Pilarova et al., 2020). Im Gegensatz dazu zeigten die RT-qPCRs dieser Arbeit, dass die IL-1 induzierte Expression von *ICAM1* durch die Behandlung der Zellen mit THZ531 zu jedem Zeitpunkt unterdrückt wird. *ICAM1* codiert für ein Adhäsionsprotein, welches Zell-Zell-Interaktionen verstärkt und eine wichtige Rolle bei der Leukozyten-Transmigration bzw. Rekrutierung spielt (Bui et al., 2020). Aufgrund dieser differentiellen Effekte auf die Genexpression von verschiedenen Genen, wurde die Analyse auf eine transkriptomweite Ebene ausgeweitet. Die RNASeq Analyse zeigte, dass in iFTSECs+Leervektor 1026 Gene nach 3 h IL-1 Stimulation mindestens vierfach hochreguliert wurden, wenn die Zellen mit THZ531 behandelt wurden. Die Gene, welche im Vergleich zur DMSO Kontrolle am signifikantesten induziert wurden, waren *JUNB* und *EGR1*. Bei *EGR1* (*early growth factor*) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor und einen Tumorsuppressor. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Zellantwort auf Wachstumsfaktoren und damit bei dem Zellwachstum. Eine erhöhte Expression von *EGR1* wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen entdeckt (Wang et al., 2021). Auch in den transformierten iFTSECs+mutKRAS/Myc führte die THZ531-Behandlung zu einer Hochregulation von 1110 Genen nach 3 h IL-1 Stimulation. *JUNB* wurde in diesen Zellen ebenfalls als eines der am signifikantesten hochregulierten Gene identifiziert. *JUNB* codiert für eine Untereinheit des AP-1 Transkriptionsfaktorkomplexes, welcher ebenfalls über IL-1 aktiviert wird (Eferl and Wagner, 2003; Jurida et al., 2015). Somit hat THZ531 einen starken induzierenden Effekt auf die IL-1 vermittelte Genexpression einiger Zielgene, welcher sowohl in gesunden Zellen als auch in transformierten Krebszellen in einem vergleichbaren Ausmaß auftritt. Anreicherungsanalysen der Gene, welche mindestens vierfach und signifikant hochreguliert wurden, zeigten allerdings kaum eine Anreicherung von inflammatorischen Prozessen (unter den TOP 20 tauchte lediglich der Prozess *negative regulation of T cell mediated immunity* auf). Hauptsächlich wurden Prozesse wie *RNA polymerase I promotor opening*, *mRNA 5' splice site recognition* und *formation of snRNP* angereichert.

Andererseits supprimierte THZ531 die Expression vieler IL-1 Zielgene. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass die TNF induzierte Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen nach einer Behandlung von U937 Zellen mit THZ531 verringert ist. Der CDK Inhibitor THZ531 fördert den TNF-induzierten Zelltod, was wiederum eine verstärkte Entzündungsreaktion z.B. durch die Aktivierung von infiltrierenden Phagozyten zur Folge hat (Tanzer et al., 2021). Die transkriptomweite Analyse offenbarte, dass in den iFTSECs+Leervektor 995 Gene im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle mindestens vierfach herunterreguliert wurden. Auch in den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde die IL-1 vermittelte Expression von 683 Genen verringert. Diese Ergebnisse verdeutlichen den selektiven bzw. differentiellen Effekt von THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression. Unter den Genen, deren Expression unterdrückt wurde, tauchten auch *ICAM1* und *VCAM1* auf. Metascape-Analysen der herunterregulierten Gene zeigten, dass viele Prozesse, welche eine Rolle bei der Entzündungsreaktion spielen, signifikant angereichert wurden (*cytokine signaling in immune system, positive regulation of NF- κ B transcription factor activity, NF- κ B signaling, T cell activation* usw.). THZ531 hat somit wie Flavopiridol eine supprimierende Wirkung auf die Genexpression von Entzündungsgenen. Die Unterdrückung der Expression dieser Gene könnte ebenfalls durch die veränderte Phosphorylierung der CTD erklärt werden. Es ist bereits bekannt, dass THZ531 genspezifische Wirkungen hat, was vor allem dazu führt, dass DNA-Reparaturgene supprimiert werden. Dies ist auf eine frühzeitige Termination der Transkription zurückzuführen (Choi et al., 2020; Chou et al., 2020; Pilarova et al., 2020). Eventuell hat THZ531 ähnliche Effekte auf die IL-1 Zielgene. Eine effiziente Transkription ist vermutlich nicht möglich. Allerdings wurden die supprimierenden Effekte bisher vor allem für lange Gene beschrieben, welche IPAs besitzen (Blazek et al., 2011; Dubbury et al., 2018; Krajewska et al., 2019). Ein prominentes Gen, welches durch THZ531 herunterreguliert wird ist *BRCA1* (Krajewska et al., 2019), welches ca. 125,000 Basen besitzt. *ICAM1* hingegen besitzt lediglich 15,000 Basen. Es handelt sich hierbei somit eher um ein kurzes Gen, dessen IL-1 induzierte Expression durch THZ531 supprimiert wird, so dass die Hemmung der Elongation durch THZ531 möglicherweise keine große Rolle spielt. Da die Mechanismen der genspezifischen Effekte von THZ531 unbekannt sind, könnte in zukünftig durch Analyse des mRNA *turnovers* genauer analysiert werden, ob die Transkription supprimiert oder lediglich verlangsamt ist.

Die supprimierende Wirkung des Inhibitors war in den iFTSECs+mutKRAS/Myc gegenüber den iFTSECs+Leervektor stark verringert. Dies zeigten sowohl die Western Blot Analysen als auch die Genexpressionsanalysen. Gene, welche eine Rolle bei Prozessen wie *positive regulation of cell death, apoptotic signaling pathway, regulation of cytokine production, leukocyte differentiation* oder *regulation of toll-like receptor signaling pathway* spielen, wurden in den iFTSECs+Leervektor mindestens vierfach herunterreguliert. In den

iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden diese Prozesse nicht angereichert. Die transformierten Krebszellen schienen daher resistent gegenüber der Inhibition von CDK12/13 zu sein.

Zusätzlich zu den Genexpressionsanalysen wurden Sekretomanalysen durchgeführt, um die Korrelation von mRNA Änderungen mit den letztlich in der Tumormikroumgebung entscheidenden Änderungen des Sekretoms zu überprüfen. ELISA-Experimente zeigten, dass IL-8, CXCL2 und CCL20 in allen verwendeten Krebs-Zelllinien durch die Behandlung der Zellen mit THZ531 nach erfolgter IL-1 Stimulation (16 h) verstärkt sekretiert wurden. In den iFTSECs und iFTSECs+Leervektor wurde hingegen keine signifikant verstärkte Sekretion dieser Chemokine beobachtet. Das IL-1 induzierte *shedding* bzw. die Spaltung von ICAM1 wurde in allen verwendeten Zelllinien unterbunden. Auch die Olink Analyse offenbarte einen differentiellen Effekt von THZ531. Allerdings wurde gezeigt, dass dieser Inhibitor insgesamt einen sehr schwachen Hemmeffekt auf das Sekretom der Zellen hatte. Lediglich die Sekretion von 7 Proteinen in den iFTSECs+Leervektor und 3 Proteinen in den iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde durch THZ531 nach erfolgter IL-1 Stimulation im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen verstärkt ($\log_2FC \geq 2$ und $p \leq 0.05$). Die Sekretion von TNF wurde in beiden Zelllinien durch THZ531 erhöht. Im Gegenzug wurden 23 Proteine in den iFTSECs+Leervektor und 15 Proteine in den iFTSECs+mutKRAS/Myc herunterreguliert. Auch die Analyse des Sekretoms deutete auf einen geringeren Effekt des Inhibitors auf die transformierten Krebszellen hin. Die iFTSECs+mutKRAS/Myc schienen eine gewisse Resistenz gegenüber THZ531 zu entwickeln.

Die verfügbare Literatur suggeriert, dass es sich bei THZ531 in Bezug auf die anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekte um einen vielversprechenden Inhibitor für die Tumorthherapie handelt (Cesari et al., 2023; Shyamsunder et al., 2022; Zhang et al., 2016). Die hier erhobenen Befunde stellen eine solche Anwendung möglicherweise in Frage, da THZ531 zum einen pro-inflammatorische Effekte, die im Tumormikromilieu eine wichtige Rolle spielen, differentiell modulieren kann und andererseits nicht besonders effektiv das Sekretom hemmt. Die Ergebnisse zeigten, dass THZ531 sogar zu einer erhöhten Expression und Sekretion einiger Chemokine führte. Normalerweise ist die Produktion und Freisetzung von Zytokinen bzw. Chemokinen unter strikter Kontrolle (Yoo et al., 2009). Zytokine sind wichtige Mediatoren der Zell-Zell-Kommunikation (Altan-Bonnet and Mukherjee, 2019). Außerdem regulieren Zytokine das Zellwachstum. Eine unkontrollierte und konstitutive Expression hat tumor-fördernde Effekte (Negus and Balkwill, 1996; Yoo et al., 2009).

Tumore mit einer CDK12-Mutation zeigen generell eine erhöhte Aktivierung von Chemokinen wie beispielsweise CCL18 und CXCL8 (Wu et al., 2018). In dieser Arbeit wurde außerdem CXCL2 als eines der Chemokine identifiziert, welches durch die THZ531-Behandlung verstärkt sekretiert wird. Eine Überexpression von CXCL2 ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose

im Ovarialkarzinom (Zhang et al., 2021a). Auch die IL-1 induzierte Expression bzw. Sekretion von IL-8 wurde durch THZ531 verstärkt. Dieses Chemokin ist ein lokaler Entzündungsmediator, welcher eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis und Degranulation von Leukozyten spielt (Harada et al., 1994; Russo et al., 2014). Gleichzeitig hat IL-8 einen starken Einfluss auf die Angiogenese, die Metastasierung und das Tumorwachstum (Zhu et al., 2012). Antikörper, welche gegen IL-8 gerichtet sind, werden bereits als Krebstherapie getestet (Bilusic et al., 2019; Liu et al., 2023). Bei einer Behandlung von Tumorerkrankungen mit THZ531 sollten diese Aspekte beachtet werden, denn eine durch den Inhibitor bewirkte erhöhte Expression der Zytokine könnte den gegenteiligen Effekt zur Folge haben.

Andererseits werden verschiedene Zytokin-Therapien bereits als Krebstherapie getestet oder eingesetzt. IL-2, IFN, CCL21, G-CSF (CSF3) und GM-CSF (CSF2) fördern bekanntermaßen eine anti-tumor Immunität. Es kommt zu einer verstärkten Aktivierung des Immunsystems. Klinische Studien mit IFN α , CSF, IL-2, IL-12, IL-15 und IL-21 zeigten bereits eine hohe Effizienz in murinen Krebsmodellen (Conlon et al., 2019; Qiu et al., 2021). Eine erhöhte Expression der IL-1 Zielgene könnte somit auch zu einer erhöhten Immunantwort führen und damit zur Tumorbekämpfung beitragen. In diesem Fall könnte THZ531 vielleicht auch die Wirkung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren verstärken (Antonarakis et al., 2020; Li et al., 2020; Wu et al., 2018).

Auf der anderen Seite supprimiert der Inhibitor die Expression und Sekretion vieler IL-1 Zielgene. Die Expression und Freisetzung von ICAM1 und VCAM1 wird beispielsweise inhibiert. Beide Adhäsionsmoleküle fördern Tumorwachstum und Invasion. Eine Inhibition könnte somit tumor-supprimierende Wirkungen haben. Für den Einsatz von THZ531 für die Krebstherapie müssen diese Aspekte somit exakt abgewogen werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist es dafür offenbar notwendig, die genauen Wirkmechanismen des Inhibitors in jeder einzelnen Tumorentität weiter aufzuklären.

5.1.3 On und off target Effekte der zielgerichteten Degradation von CDK12 und CDK13 durch den PROTAC BSJ-4-116

CDK12 und CDK13 zeichnen sich im Vergleich zu anderen CDKs durch ein hohes Molekulargewicht aus (Malumbres, 2014; Pilarova et al., 2020). Zusätzlich zur zentral gelegenen Kinasedomäne besitzen beide Kinasen, genauso wie viele Spleißfaktoren (SR-Proteine), mehrere Arginin- und Serin-reiche Regionen (RS-Regionen) am N-Terminus, welche die Lokalisation von CDK12/13 in nuklearen *speckles* determinieren können. Des Weiteren haben beide Kinasen Prolin-reiche Regionen, welche für Protein-Protein und Protein-RNA-Interaktionen wichtig sind (Choi et al., 2020; Ghosh and Adams, 2011; Ko et al., 2001; Pilarova et al., 2020). Aus diesem Grund ist es interessant, den Phänotyp einer vollständigen

Degradation der Proteine im Vergleich zur Inhibition der enzymatischen Aktivität zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein sogenannter PROTAC (*proteolysis-targeting chimera*) eingesetzt. Wie bereits in Kapitel 1.8.1 beschrieben, nutzt dieses Prinzip zellpermeable, niedermolekulare Verbindungen, die einerseits ein Zielprotein binden und andererseits eine E3-Ubiquitin-Ligase. Die räumliche Nähe dieser Komponenten führt zur Ubiquitinierung und schlussendlich zum proteasomalen Abbau des Zielproteins. Dieser Ansatz ist daher eine sehr interessante Alternative zur Blockade von Enzymen, insbesondere dann, wenn das Protein neben der enzymatischen Funktion weitere Funktionen besitzt. In 2001 wurde der erste PROTAC gegen die Methionin-Aminopeptidase-2, ein in die Angiogenese und andere Funktionen involviertes Metalloenzym, beschrieben (Sakamoto et al., 2001). Seitdem wurden PROTACs für vielfältige Anwendungen entwickelt (Nalawansa and Crews, 2020; Ocana and Pandiella, 2020; Verma et al., 2020; Zhou et al., 2020), z.B. um die Degradation von Rezeptoren (Jia and Han, 2023), Kinasen (Buhimschi et al., 2018; Crew et al., 2018; Cromm et al., 2018), Transmembranproteinen (Bensimon et al., 2020), GTPasen (Bond et al., 2020) oder Transkriptionsfaktoren (Bai et al., 2019; Liu et al., 2021c) einzuleiten. Aktuell werden PROTACs, welche gegen den Androgen-Rezeptor (ARV-110), für die Behandlung von Prostatakrebs (Gao et al., 2022), oder gegen den Östrogen-Rezeptor (ARV-471), für die Behandlung von Brustkrebs, gerichtet sind (Hamilton et al., 2022), in klinischen Phase I / II Studien getestet (Qi et al., 2021). Auch über Palbociclib-basierte PROTACs für die induzierte Degradation von CDK4/6 wurde kürzlich berichtet (Rana et al., 2019).

BSJ-4-116 ist ein PROTAC, welcher spezifisch gegen CDK12 gerichtet ist. Wie in Kapitel 1.8.1 bereits beschrieben, wurde als Grundgerüst der Cereblon (CRBN)-abhängige Multi-Kinase PROTAC TL12-186 verwendet. Das 4-(1-Piperazinyl)-anilin von TL12-186 wurde durch ein (R)-3-Aminopiperidin ersetzt, um den spezifischen CDK12-PROTAC zu erzeugen. Das (R)-3-Aminopiperidin stammt dabei aus dem selektiven CDK12/13 Inhibitor THZ531 (Jiang et al., 2021). Erste Ergebnisse zeigten, dass BSJ-4-116 pro-apoptotische und anti-proliferative Effekte aufweist (Jiang et al., 2021). Außerdem verursacht der PROTAC eine frühzeitige Termination der Transkription von langen Genen durch die Verwendung von intronischen Polyadenylierungsstellen, wovon offenbar vor allem DNA-Reparaturgene und Replikationsgene betroffen sind. Außerdem sensitiviert BSJ-4-116 Jurkat und MOLT-4 Leukämiezelllinien für PARP-Inhibitoren (Jiang et al., 2021). Diese spezifischen Effekte demonstrieren eine erfolgte Degradation von CDK12 und sind vom Phänotyp her vergleichbar mit den Effekten von THZ531 (Jiang et al., 2021; Zhang et al., 2016).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten zunächst einige der zuvor genannten Phänotypen. Zu nennen sind hierbei die anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekte des PROTACs. Mikroskopieaufnahmen und die Detektion von cleaved-PARP im Western Blot zeigten, dass die Anzahl an apoptotischen Zellen dosis-abhängig zunahm. In Übereinstimmung mit dem

Konzept, dass CDK12 die RNA-Pol II CTD phosphoryliert, wurde auch die Phosphorylierung von Ser2 der CTD von RNA-Polymerase II dosis-abhängig reduziert. Hierfür war in HCT116 eine Konzentration von 500 nM erforderlich.

Weitere Experimente mit dieser Konzentration des PROTAC zeigten, dass nicht nur CDK12, sondern auch CDK13 durch die Behandlung der Zellen mit BSJ-4-116 degradiert wird. Dieser PROTAC ist somit nicht spezifisch für CDK12.

Um den Einfluss auf den NF- κ B Signalweg zu untersuchen, wurden HCT116 und HeLa Zellen mit 500 nM BSJ-4-116 behandelt und zusätzlich mit IL-1 stimuliert. Unerwarteterweise wurde der IL-1 Signalweg durch die Behandlung der Zellen mit BSJ-4-116 auf mehreren Ebenen beeinflusst. Die IL-1 induzierten Phosphorylierungen von IKK α , IKK β , I κ B α und p65 waren stark reduziert, genauso wie die Gesamtproteinmengen der jeweiligen Komponenten. I κ B α wurde allerdings weiterhin signalabhängig degradiert und re-synthetisiert, wobei die I κ B α Gesamtproteinmenge stets verringert war. *Downstream* im IL-1 Signalweg zeigten Genexpressionsanalysen, dass die Expression aller getesteten IL-1 Zielgene ebenfalls stark reduziert war. Doch nicht nur die Expression von IL-1 Zielgenen, sondern auch die Expression von *IKBKB* und *IKBK*G mRNAs war verringert. Diese Transkripte codieren für IKK β und IKK γ und somit für *upstream* Komponenten des IL-1 Signalwegs. BSJ-4-116 hat somit einen Einfluss auf den gesamten IL-1 Signalweg.

Die publizierte IC₅₀ von BSJ-4-116 für CDK12 liegt *in vitro* (Jurkat T-Zellen) bei 6 nM und damit bei einer sehr geringen Konzentration (Jiang et al., 2021). Aus diesem Grund war es wichtig, die Dosisabhängigkeit der zuvor genannten Effekte zu untersuchen. Sowohl 250 nM als auch 100 nM BSJ-4-116 reichten aus, um neben CDK12 auch CDK13 unspezifisch zu degradieren, wobei bei 100 nM keine Reduzierung der Phosphorylierung von Ser2 der CTD mehr nachgewiesen werden konnte. Die Effekte auf den IL-1 Signalweg waren unter Verwendung von 250 nM BSJ-4-116 vergleichbar zu denen unter Verwendung von 500 nM BSJ-4-116. Außerdem wurde die IL-1 induzierte Expression und Sekretion der IL-1 Zielgene weiterhin reduziert. Wurden lediglich 100 nM BSJ-4-116 eingesetzt, so traten die Effekte auf den IL-1 Signalweg in einem verringerten Ausmaß auf. Insbesondere die IL-1 induzierten Phosphorylierungen von IKK β , I κ B α und p65 waren aber weiterhin eindeutig vermindert. Dagegen waren 100 nM BSJ-4-116 nicht mehr ausreichend, um die IL-1 induzierte Sekretion von IL-8, CXCL2 und CCL20 zu supprimieren. Experimente mit Dosen < 100 nM erschienen deshalb im Kontext der hier untersuchten Modellsysteme nicht sinnvoll.

Neben der Dosisabhängigkeit zeigten weitere Ergebnisse, dass der PROTAC BSJ-4-116 den IL-1 Signalweg auch zeitabhängig beeinflusste. Während die erwartete Degradation von CDK12 (und von CDK13) erst bei einer Behandlung der Zellen mit BSJ-4-116 für 24 h nachweisbar war, traten einige der inhibitorischen Effekte auf den IL-1 Signalweg (z.B. die

reduzierte Phosphorylierung und Gesamtproteinmenge von I κ B α) bereits nach 3 h Behandlung mit BSJ-4-116 auf. Auch die induzierte Genexpression aller getesteten IL-1 Zielgene war bereits nach 3 h BSJ-4-116-Behandlung reduziert. Demgegenüber wurde die Suppression der IL-1 induzierten Phosphorylierungen von p65 und IKK β erst nach 24 h Behandlung mit BSJ-4-116 beobachtet und korrelierte daher mit dem Zeitpunkt der im Western Blot messbaren Reduktion der CDK12 und CDK13 Gesamtproteinmengen.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist daher die Beobachtung, dass ein neuer gegen CDK12 gerichteter PROTAC einerseits sehr wirksam CDK12 degradiert, andererseits aber nicht nur ähnlich effektiv einen Abbau der CDK13 Isoform induziert, sondern auch dosis- und zeitabhängig *off target* Effekte auf das gesamte IL-1-NF- κ B System ausübt. Die schnellen (innerhalb von 3 h auftretenden) Effekte wurden dabei bei noch normalen CDK12/13 Levels beobachtet und scheinen damit komplett unabhängig von einer CDK12/13 Degradation zu sein. Dieser PROTAC ist daher für die Untersuchung der spezifischen, mechanistischen Rolle von CDK12/13 bei der basalen und (Zytokin-) induzierbaren Genexpression problematisch.

Für diese unerwarteten Phänotypen kommen mehrere mögliche Erklärungen in Betracht. Es könnte sein, dass nach Passage der Zellmembran der PROTAC die ATP Bindungsstelle von CDK12 schnell und stabil bindet, so dass die Kinaseaktivität bereits innerhalb sehr kurzer Zeit gehemmt wird, während die Ubiquitinierungs-abhängige Degradation zeitlich verzögert einsetzt. Dies wäre plausibel, da die Struktur von BSJ-4-116 auf dem CDK12/13 Inhibitor THZ531 basiert, welcher in Nähe der ATP-Bindestelle bindet (Jiang et al., 2021). Insofern wären die schnellen zellulären Effekte von der Proteinkinaseaktivität dominiert, während die späten Effekte den Verlust des gesamten CDK12 Proteins reflektieren. Um diese Hypothese zu überprüfen und zwischen den Effekten zu differenzieren, könnten Cereblon-Inhibitoren (z.B. Thalidomid, MLN4924 oder Lenalidomid) eingesetzt werden, die den Abbau der Zielproteine durch das Proteasom verhindern (Jiang et al., 2021; Lopez-Girona et al., 2012).

Eine weitere Erklärung wäre, dass der PROTAC an die Kinasedomäne der anderen untersuchten Proteinkinasen aus dem IL-1-NF- κ B Signalweg bindet und so z.B. IKKs oder TAK1 inhibiert. Eine „Kreuzreaktion“ von ATP-kompetitiven oder irreversiblen Proteinkinase Inhibitoren ist ein häufig beobachtetes Phänomen und sehr intensiv untersucht worden (Bain et al., 2003; Bain et al., 2007; Davies et al., 2000). Es gibt sogar in der Tumorthherapie eingesetzte Multi-Proteinkinasehemmstoffe, die gezielt genutzt werden, weil sie weniger selektiv sind und mehrere Proteinkinasen vergleichbar effektiv inhibieren (Cohen et al., 2021). Ein Beispiel hierfür ist Sorafenib (Nexavar®), welches für die Behandlung von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen, beim hepatozellulären Karzinom (HCC) und beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom zugelassen ist und die Aktivität von CRAF, BRAF, V600E, BRAF, c-KIT und FLT-3, CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3 und PDGFR- β inhibiert (Gild et

al., 2021; Wilhelm et al., 2006). Weitere Multikinase-Inhibitoren, welche für die Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt werden sind Imatinib und Regorafenib (Capdeville et al., 2002; Freissmuth et al., 2019).

Über solche Effekte und potentiell nutzbare pharmakodynamische Eigenschaften bei der Anwendung in präklinischen Modellen oder im Menschen ist bei PROTACS nur sehr wenig bekannt und diese Substanzen werden aktuell eher wegen ihrer Spezifität diskutiert (Bekes et al., 2022).

In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass bereits in der Erststudie zu BSJ-4-116 in Proteomanalysen von Jurkat T-Zellen, die für 8 h mit 50 nM der Substanz behandelt wurden, die CDK13 Kinase durch BSJ-4-116 supprimiert wurden. Eine umfangreiche *in vitro* Messung der Proteinkinaseaktivität, ein sogenannter KINOME Scan, zeigte zudem, dass mehrere MAP-Kinasen (MAPK9, MAPK10, MAPK8, MAPK15, MAPK3, MAPK1) durch BSJ-4-116 in einer Konzentration von 1 μ M gebunden werden (Percent of control - PoC $\leq$ 35) (Jiang et al., 2021). Für die Auslösung messbarer zell-basierter Effekte waren in dieser Arbeit BSJ-4-116 Konzentrationen zwischen 100-250 nM erforderlich. Diese Konzentrationen sind niedrig bzw. im üblichen Rahmen hochpotenter Proteinkinasewirkstoffe (Bain et al., 2003; Bain et al., 2007). Sie waren allerdings eventuell trotzdem bereits zu hoch für einen selektiven Effekt auf CDK12 oder zeigen eine geringe therapeutische Breite von BSJ-4-116 in Bezug auf die Differenz der Konzentrationen, welche erwünschte bzw. unerwünschte *off target* Effekte auslösen.

Basierend auf diesen Ausführungen sind die in dieser Arbeit identifizierten *off target* Effekte von BSJ-4-116 daher nicht nur negativ zu bewerten, sondern könnten möglicherweise auch, ähnlich wie bei Sorafenib oder Imatinib, therapeutisch genutzt werden. Hierbei sollten auch weitere PROTACS für CDK12 wie der PROTAC PP-C8 (Niu et al., 2022) oder der duale CDK12/13 Degrader 7f (Yang et al., 2022) detailliert und im Vergleich zu BSJ-4-116 getestet werden. PP-C8 führt im Gegensatz zu BSJ-4-116 auch zu einem Abbau von Cylin K, dem prinzipiellen mit CDK12/13 interagierenden Cyclin (Niu et al., 2022). Aufgrund der ähnlichen Kinasedomänen (93 % Sequenzhomologie) wird es auch zukünftig sehr schwer sein, einen spezifischen Inhibitor bzw. PROTAC für CDK12 oder CDK13 zu entwickeln (Pilarova et al., 2020). Trotzdem zeigt diese neue Klasse an anti-CDK12/13 Wirkstoffen sehr interessante pharmakodynamische Eigenschaften aufgrund ihrer kombinierten pro-apoptotischen, anti-proliferativen und, wie in dieser Arbeit gezeigt, anti-inflammatorischen Effekte im Zytokin-regulierten NF- κ B System. Die weitere Untersuchung von BSJ-4-116 sollte daher in präklinischen Modellen der Entzündung und eines pro-inflammatorischen Tumormikromilieus erfolgen.

5.1.4 Einfluss der konditionalen, genetischen Depletion von CDK12

Zusätzlich zur Verwendung des PROTACs wurden genetische Modelle verwendet, um CDK12 und CDK13 gezielt und spezifisch zu depletieren. Das hier etablierte Auxin-induzierbare Depletionssystem ist für CDK12 bis jetzt nicht verfügbar gewesen. Der wesentliche Vorteil ist die zügige und reversible Depletion des Zielproteins.

Die Charakterisierung von mehreren CDK12-Degron monoklonalen HCT116 Zelllinien zeigte insgesamt erniedrigte basale CDK12 Level. Dies wäre erklärbar mit einer gewissen *leakiness* der tet-regulierbaren OsTIR1 Expression, so dass CDK12 permanent in einem geringen Maß abgebaut wird. Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, welches bereits für andere Faktoren (z.B. NCBP1 und SIN3A) in diesem System gezeigt wurde (unpublizierte Daten - AG Kracht). Alternativen wären ein vor kurzem publiziertes optimiertes System mit einer OsTIR1 Mutante (Yesbolatova et al., 2020) oder die Verwendung des Auxin-Degradationsinhibitors Auxinol (Yesbolatova et al., 2019). Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten allerdings, dass Auxinol keinen Einfluss auf die Re-Synthese von NCBP1 hatte. Auffällig war weiterhin, dass auch die induzierte Expression von OsTIR1 in den HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-(mClover)-Monoklonen im Vergleich zu HCT116 tet-OsTIR1 WT Zellen verringert war, was aber keinen Einfluss auf die Auxin-induzierbare Degradation von CDK12 in verschiedenen monoklonalen Zelllinien hatte.

Da die CDK12-Degron Monoklone normal proliferierten und vor allem eine unveränderte IL-1 induzierbare Signaltransduktion und Genexpression zeigten, wurde entschieden, eine dieser aufwändig hergestellten Zelllinien genauer zu charakterisieren.

Entgegen des gängigen Konzeptes von CDK12 als CTD Kinase, hatte die Auxin-vermittelte Depletion von CDK12 keinen Einfluss auf die im Zellextrakt gemessene globale Phosphorylierung von Ser2 der CTD (Bartkowiak et al., 2010; Blazek et al., 2011). Neuere Arbeiten deuteten bereits auf *off target* Effekte von THZ531 bei höheren Konzentrationen hin (Chirackal Manavalan et al., 2019; Krajewska et al., 2019). Es scheint so zu sein, dass eine relativ geringe, globale Abnahme der Ser2-CTD Phosphorylierung vor allem über einem Subset an Genen der *DNA damage response* beobachtet wird und die stärkeren Effekte von THZ531 durch *off target* Effekte erklärt werden.

Um mögliche redundante Funktionen von CDK12/13 zu identifizieren, erfolgte zusätzlich eine parallele Depletion von CDK13 mittels siRNAs. Weder die isolierte Depletion von CDK12 noch die Ko-Depletion von CDK12/13 hatte einen mit THZ531 oder BSJ-4-116 vergleichbaren Effekt auf die IL-1 Signaltransduktion. Insgesamt waren die IL-1 induzierten Phosphorylierungen von p65, IκBα und IKKβ nur leicht reduziert. Auch die Genexpressionsanalysen zeigten, dass lediglich die mRNA Expression von *CXCL2* und *NFKBIA* leicht reduziert war, wenn die Zellen mit siCDK13 transfiziert und mit Auxin behandelt wurden. Insgesamt sorgte die Ko-Depletion

beider Kinasen für einen verstärkten Effekt im Vergleich zur Depletion nur einer der beiden Kinasen. Der Effekt auf den IL-1 Signalweg blieb aber insgesamt gering. Diese Befunde wurden erst gegen Ende der Arbeit erhoben und bedürfen daher einer Validierung in zumindest einem weiteren CDK12-Degron Klon und einer ausführlicheren Untersuchung von verschiedenen Ebenen der Genexpression. Vor kurzem wurde beschrieben, dass eine akute Hemmung von CDK12 mit dem zellpermeablen ATP-Adenin Analog 1-NM-PP1 in HeLa CDK^{AS} (*analogue sensitive*) Zellen zu einem geänderten Spleißmuster und vor allem auch einer geänderten mRNA Halbwertszeit von vielen Genen führt. In diesen Zellen wurde die ATP Bindungsstelle durch CRISPR/Cas9 so mutiert, dass die Kinase spezifisch nur durch 1-NM-PP1 gehemmt wird. Dies ließ darauf schließen, dass CDK12 sowohl eine Rolle bei der Elongation, der Termination aber auch beim Spleißen und dem mRNA *turnover* spielt (Bartkowiak et al., 2015; Magnuson et al., 2022). Es ist daher denkbar, dass in den CDK12-Degron Zellen verringerte Transkriptions-, Elongations- oder Spleißraten durch verlängerte mRNA Halbwertszeiten über einen post-transkriptionellen Mechanismus ausgeglichen werden und sich die mRNA Spiegel der bisher untersuchten IL-1-NF-κB Zielgene nur gering geändert haben. Ein solches Phänomen wird als *transcript buffering* beschrieben (Timmers and Tora, 2018). Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte vor und nach Auxin-abhängiger CDK12 Depletion der mRNA *turnover* mittels metabolischer Markierung der Nukleotide oder mittels Puls-*chase* Experimenten für einzelne Transkripte oder auch transkriptomweit durch *nascent* RNAseq untersucht werden (Lugowski et al., 2018; Palozola et al., 2021; Wissink et al., 2019).

Zusammenfassend relativieren die Ergebnisse in dem Auxin-regulierbaren System die globale Rolle von CDK12/13 in einem induzierbaren (d.h. Zytokin-stimulierbaren) System und führen, im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen mit den pharmakologischen Inhibitoren, zu der interessanten und neuen Schlussfolgerung, dass im IL-1-NF-κB Signalweg der Verlust von CDK12/13 kompensiert werden kann oder dass diese Proteinkinasen im kanonischen IL-1-NF-κB Signalweg keine essentielle Rolle spielen. Auch in der Literatur sind bereits häufiger Subsets an CDK12/13 regulierten Genen beschrieben worden (Blazek et al., 2011; Chirackal Manavalan et al., 2019; Dubbury et al., 2018; Krajewska et al., 2019), was wiederum damit vereinbar wären, dass beide Kinase selektive und nicht globale Funktionen in der transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation von Genen ausüben.

5.1.5 Eine vergleichende, zusammenfassende Betrachtung der CDK12/13 Inhibitoren und ihrer Effekte auf den IL-1 Signalweg

CDKs wurden in dieser Arbeit pharmakologisch und genetisch perturbiert, um die resultierenden Phänotypen in Bezug auf die IL-1 induzierte NF-κB Aktivierung, Genexpression und Proteinsekretion systematisch zu untersuchen. Dafür wurden verschiedene Zellsysteme verwendet: (i) HCT116 Colonkarzinomzellen, (2) HeLa Zervixkarzinomzellen, (iii) OVCAR-4

Ovarialkarziomzellen und (iv) *fallopian tube secretory epithelial cells* (iFTSECs), welche entweder mit einem Leervektor transduziert oder mittels Überexpression von MYC und Expression einer *gain-of-function* KRAS-Mutante transformiert wurden. All diese Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit verschiedener CDK Inhibitoren mit IL-1 stimuliert und systematisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellmodelle eine ähnliche IL-1 Responsivität aufwiesen. Somit war eine vergleichende Analyse ermöglicht.

Die Transformation der iFTSECs führte zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen (Dreute, 2023). Außerdem war die Phosphorylierung von Rb in den iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu untransformierten iFTSECs stark erhöht. Transkriptomweite Analysen zeigten, dass die Transformation der iFTSECs ein verändertes Genexpressionsprofil zur Folge hatte. Eine Überexpression von Myc hat massive Auswirkungen auf die Zelle, da die Anzahl an Myc-regulierten Genen und biologischen Prozessen sehr groß ist. Nahezu jeder anabolische und wachstumsfördernde Prozess ist von Myc abhängig. Myc ist somit ein starkes Onkogen (Ahmadi et al., 2021; Baluapuri et al., 2020; Dong et al., 2020; Duffy et al., 2021). Die Expression von *CDK12* und *CDK13* wurde allerdings nicht beeinflusst. In Bezug auf den IL-1 Signalweg zeigten die Analysen, dass die IL-1 Responsivität der transformierten Zellen verringert war. Der Prozess *interferon signaling* wurde in den iFTSECs+mutKRAS/Myc im Vergleich zu den iFTSECs+Leervektor durch die IL-1 Stimulation nicht induziert. Interessant wäre eine Behandlung der Zellen mit IFN γ , um eine Responsivität für dieses Interferon zu untersuchen. Zudem wurden einige IL-1 Zielgene (*NFKBIA*, *ICAM1*, *BIRC3*) in den iFTSECs+mutKRAS/Myc in einem geringen Ausmaß exprimiert, während die Sekretion von CXCL2 erhöht war. Die Sekretion von CCL20 und ICAM1 war wiederum verringert.

Alle verwendeten CDK Inhibitoren (Flavopiridol, THZ531 und BSJ-4-116) zeigten einen negativen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (Abb. 5.1). Die Phosphorylierung von Rb wurde durch Flavopiridol deutlich verringert. Auch THZ531 hatte nach einer längeren Behandlungszeit einen reduzierenden Einfluss auf die Rb-Phosphorylierung. Mikroskopisch konnte mit allen Inhibitoren eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen festgestellt werden. THZ531 und BSJ-4-116 führten zu einer detektierbaren Menge an cleaved-PARP, einem Apoptose-Marker (Oliver et al., 1998). Somit zeigten alle verwendeten pharmakologischen CDK Inhibitoren einen anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekt. Die Degradation von CDK12 und CDK13 mittels genetischer Modelle hatte hingegen keinen sichtbaren Einfluss auf die Proliferation und Viabilität der Zellen.

Zudem beeinflussten alle drei Inhibitoren die RNA-Polymerase II. Sowohl die Ser2-Phosphorylierung als auch die Gesamtproteinmenge von Pol II war jeweils reduziert. Die Auxin-induzierte Degradation von CDK12 hatte keinen Einfluss auf die CTD-Phosphorylierung.

Auf den IL-1 Signalweg hatten die Inhibitoren hingegen divergierende Einflüsse. Flavopiridol suppressierte die Re-Synthese von I κ B α vollständig. Auch die IL-1 induzierte Synthese von A20 wurden vollständig unterdrückt. Die Phosphorylierung und Gesamtproteinmenge von p65 wurde lediglich affektiert, wenn die Zellen für einen Zeitraum von mindestens 17 h mit Flavopiridol behandelt wurden. Der selektive CDK12/13 Inhibitor THZ531 hatte lediglich eine verlangsamte bzw. verringerte (Re)-Synthese von I κ B α und A20 zur Folge. Die Synthese war nicht vollständig suppressiert. Auch hier wurde die Phosphorylierung und Gesamtproteinmenge von p65 lediglich reduziert, wenn die Zellen für einen Zeitraum von mindestens 17 h mit THZ531 behandelt wurden. Der PROTAC BSJ-4-116, welcher die Degradation von CDK12 (und nachweislich auch CDK13) induziert, suppressierte hingegen die Aktivität aller getesteten Komponenten des NF- κ B Signalwegs. Sowohl die Gesamtproteinmengen als auch die IL-1 induzierten Phosphorylierungen von IKKs, I κ B α und p65 waren reduziert. Außerdem war die (Re)-Synthese von I κ B α und A20 blockiert. Die genetische Degradation von CDK12 und CDK13 mittels Degron-Induktion oder siRNAs hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung des IL-1 Signalwegs.

Die IL-1 induzierte Genexpression und Proteinsekretion wurde von Flavopiridol vollständig suppressiert. Die Behandlung der Zellen mit BSJ-4-116 führte ebenfalls zu einer verringerten mRNA Menge und Proteinmenge aller getesteten Gene/Proteine. Allerdings war der suppressierende Effekt im Vergleich zu Flavopiridol abgeschwächt und konzentrationsabhängig. THZ531 hatte hingegen einen differentiellen Effekt auf die Genexpression und Proteinsekretion. Einige Gene wurden verstärkt exprimiert, während die Expression anderer Gene verringert wurde. Die iFTSECs+mutKRAS/Myc schienen im Vergleich zu iFTSECs+Leervektor eine gewisse Resistenz gegenüber THZ531 zu entwickeln. Die Effekte von Flavopiridol waren hingegen unabhängig vom genetischen Status der Zellen. Die simultane Degradation von CDK12/13 führte lediglich zu einer signifikant verringerten Expression von *NFKBIA*.

Zusammenfassend zeigen alle drei Inhibitoren einen suppressierenden Effekt auf die transkriptionelle Elongation, die Proliferation und die Zellviabilität. Die Effekte auf die IL-1-NF- κ B vermittelte Genexpression und Proteinsekretion unterscheiden sich allerdings. Diese unterschiedlichen Effekte könnten durch *off target* Effekte oder nicht-kanonische Funktionen der CDKs erklärt werden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass CDK12 in HCT116 CDK12^{AS} Zellen, in denen CDK12 spezifisch durch ein Adenin-Analogon inhibiert werden kann, neben der CTD noch weitere Substrate phosphoryliert (Qiu et al., 2023). Auch 4E-BP1, ein Translationsrepressor, wurde als Substrat von CDK12 identifiziert (Choi et al., 2019). Dass die spezifische Degradation von CDK12 und CDK13 über genetische Modelle nur schwache Effekte auf den IL-1-NF- κ B Signalweg aufweist, lässt darauf schließen, dass beide Kinasen hochspezifische Funktionen haben, welche durch andere CDKs kompensiert werden

können. Andererseits weisen die Daten auf einen nicht-kanonischen, IL-1 regulierten Weg der Genexpression hin.

		IL-1	Transformation	Flavopiridol	THZ531	BSJ-4-116	Depletion
Transkription / Elongation	p(S2)-Pol II						
	Pol II						
Proliferation	Mikroskopie						
	p(S807/811)-Rb						
DNA-Schäden	γ H2AX						
Apoptose	cleaved-PARP						
IL-1 Signalweg	p(SS177/181)-IKK						
	IKK						
	p(S32)-I κ B α						
	I κ B α						
	p(S536)-p65						
	p65						
IL-1 induzierte Genexpression	A20						
	IL8						
	CXCL2						
	CCL20						
	NFKBIA						
	ICAM1						
IL-1 induzierte Proteinsekretion	BIRC3						
	IL-8						
	CXCL2						
	CCL20						
	ICAM1						

Aktivierender Effekt
 Inaktivierender Effekt
 Kein Effekt
 Nicht untersucht

Abb. 5.1 Schematische Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen der verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren und genetischen Modelle.

CDKs wurden pharmakologisch (Flavopiridol, THZ531, BSJ-4-116) oder genetisch (Auxin-induzierte Degradation, siRNAs) perturbiert, um die resultierenden Phänotypen in Bezug auf die IL-1 induzierte NF- κ B Aktivierung, Genexpression und Proteinsekretion systematisch zu untersuchen. rot: Aktivierung; blau; Inaktivierung; grau: kein Effekt; weiß: N/A (nicht untersucht).

5.2 Unvoreingenommene Identifizierung des IL-1 induzierten Sekretoms in Anwesenheit von Serum

Das sezernierte Proteom umfasst die Gesamtheit aller Proteine, welche von den Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben werden und wird im nachfolgenden Text vereinfacht als Sekretom bezeichnet, auch wenn das komplette Sekretom einer Zelle weitere Bestandteile enthält (beispielsweise Lipide, Nukleinsäuren etc.). Aufgrund der essentiellen Bedeutung des Sekretoms für die Zell-Zell-Kommunikation, z.B. während einer Entzündungsreaktion oder im Tumormikromilieu, ist es von großem Interesse, das Sekretom unvoreingenommen zu entschlüsseln (Capece et al., 2018; Ritchie et al., 2021). Analysen des Sekretoms über ELISA oder Cytokine Arrays sind sehr spezifisch und quantitativ, bilden allerdings nur einen kleinen Teil des Sekretoms ab und benötigen jeweils hochspezifische Antikörper. Dadurch wird das Spektrum der möglichen Analysen reduziert. Dies gilt auch für die immerhin knapp 3000 humanen Proteine, die mittlerweile über sehr gut validierte Antikörper und *proximity extension* assays (PEA) von der Firma Olink analysiert werden können (Stenken and Poschenrieder, 2015; Wik et al., 2021). Es besteht daher ein großer Bedarf an generischen Methoden, um sezernierte Proteome unvoreingenommen und Spezies-unabhängig vermessen zu können. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine Methode im IL-1 System zu

etablieren, welche die Erfassung des Sekretoms über massenspektrometrische Analysen erlaubt.

Die im Serum hochgradig abundanten Proteine (Albumin, Hämoglobine, IgGs etc.), welche im mg/ml Bereich vorliegen, können die Detektion und Quantifikation weniger abundanter Proteine (im ng/ml Bereich) verhindern oder überlagern, so dass die Analyse des Sekretoms in Anwesenheit von Serum grundsätzlich herausfordernd ist (Eichelbaum and Krijgsveld, 2014; Eichelbaum et al., 2012; Knecht et al., 2023). Allerdings gelingt es mittlerweile hochspezialisierten Laboren, Proteine auch in Patientenkohorten aus humanem Plasma zu identifizieren (Geyer et al., 2019; Niu et al., 2019; Sachs et al., 2021). Wegen dieser Problematik wurden und werden viele Sekretomanalysen von Zellkulturen unter Serum-freien Konditionen durchgeführt (Dowling and Clynes, 2011; Shin et al., 2019; Yoodie et al., 2021). Dies führt allerdings zu verzerrenden Effekten, da die Zellen oder Gewebe dabei Hungerbedingungen ausgesetzt sind (Rashid and Coombs, 2019). Eine Serum-Depletion hat Konsequenzen für die Expressions- und Phosphorylierungslevels multipler Proteine (Hasan et al., 1999; Levin et al., 2010; Pirkmajer and Chibalin, 2011; Shin et al., 2019). Außerdem beeinflusst der Serumentzug den zellulären Energiestoffwechsel (Lorenz et al., 2023) und führt zu einem Zellzyklusarrest (Oya et al., 2003; Shin et al., 2008). Deshalb wurde in dieser Dissertation eine Methode etabliert, die es erlaubt, die IL-1-regulierte Sekretomantwort in Serum-kultivierten Zellen zu erfassen.

Hierfür wurde für die Analyse von Proteinen ein noch relativ neuer Ansatz gewählt, welcher auf der sogenannten *CLICK chemistry* (KLICK Chemie oder KLICK Reaktion) basiert (Parker and Pratt, 2020). Eine klassische KLICK Reaktion ist eine Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, bei der ein Azid mit einem Alkin konjugiert wird, wobei ein Triazol entsteht (Meldal and Wenzel Tornøe, 2008; Rostovtsev et al., 2002; Tornøe et al., 2002). Lebende Zellen können flexibel mit einer Substanz, welche eine Alkingruppe oder eine Azidgruppe enthält, markiert werden. Anschließend wird die KLICK Reaktion *in situ* (z.B. auf Schnitten) oder *in vitro* (nach Lyse der Zellen) durchgeführt. Die Substanz wird dabei mit einem Biosensor konjugiert, welcher ebenfalls eine Alkingruppe oder eine Azidgruppe trägt. Bekannte Substanzen für die Markierung von neu-synthetisierten Proteinen sind L-Homopropargylglycin (L-HPG), ein Methionin-Analogon mit Alkingruppe, O-Propargyl-Puromycin (OPP), ein Puromycin-Analogon mit Alkingruppe, und L-Azidohomoalanin (AHA), ein Methionin-Analogon mit Azidgruppe. Auch neu-synthetisierte RNA kann unter Verwendung des Uridin-Analogons 5-Ethynyluridin (5-EU) markiert werden. Als Biosensor können beispielsweise Biotin-Azid bzw. Biotin-Alkin verwendet werden. Nach der KLICK Reaktion werden biotinylierte Makromoleküle über Streptavidin aufgereinigt. Alternativ können Fluoreszenzfarbstoffe mit Alkin- oder Azidgruppen verwendet werden, um markierte Proteine oder RNAs mikroskopisch zu visualisieren (Beatty et al., 2006; Dieterich et al., 2006; Forester et al., 2018; Jao and Salic,

2008; Meldal and Wenzel Tornøe, 2008; Saleh et al., 2019). In 2022 wurde der Nobelpreis für Chemie für die Entwicklung der KLINK Chemie und der bioorthogonalen Chemie an Carolyn Bertozzi, Morten Meldal und Barry Sharpless verliehen (Royal Swedish Academy of Sciences, 2022).

In der Literatur existiert eine begrenzte Anzahl an Arbeiten, welche unterschiedliche Varianten dieses Ansatzes für Sekretomanalysen verwendet haben, allerdings bisher noch nicht für ein Zytokin-reguliertes System (Eichelbaum and Krijgsveld, 2014; Eichelbaum et al., 2012; Shin et al., 2022; Zheng et al., 2021). Beispielsweise wurde in verschiedenen Zellen (z.B. PC3 oder WPMY-1 Zellen) in Anwesenheit und Abwesenheit von Serum die AHA-Markierung mit SILAC (*stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*) kombiniert. AHA wurde über die KLINK Reaktion an Alkin-aktivierte Agaroseharze gekoppelt. Dies erlaubte die Entfernung hoch-abundanter Proteine über mehrere Waschschriffe (Eichelbaum et al., 2012). Bei SILAC handelt es sich um eine Isotopen-Markierung von Aminosäuren. Zellen werden entweder mit „normalen“ Aminosäuren oder mit Aminosäuren, welche „schwere“ Isotopen besitzen, kultiviert. In der Massenspektrometrie können die Proben dann kombiniert in einem Lauf gemessen und danach anhand des Einbaus der Isotope unterschieden werden (Ong et al., 2002). Es wurden somit zwei Modalitäten verwendet, um neu-synthetisierte Proteine von Serum-Proteinen zu unterscheiden (Eichelbaum and Krijgsveld, 2014; Eichelbaum et al., 2012; Knecht et al., 2023).

Auch ohne die Kombination mit SILAC konnte vor kurzem und in Übereinstimmung mit der hier etablierten Methode gezeigt werden, dass die HPG- oder AHA-Markierung in Anwesenheit von 10 % Serum eine erfolgreiche Detektion des Sekretoms in HeLa Zellen erlaubt (Zheng et al., 2021). Eine interessante, vor kurzem publizierte Erweiterung dieser Methode erlaubt eine Differenzierung des Sekretoms von ko-kultivierten Zelltypen. Während AHA kovalent über die Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) mit der passenden tRNA verknüpft wird, benötigt das Methionin-Analogon Azido-Norleucin (ANL) eine mutierte MetRS, um an die tRNA gekoppelt zu werden. Diese wird ektopisch exprimiert, so dass nur Zellen, welche die mutierte MetRS exprimieren, ANL in neu-synthetisierte Proteine einbauen. Diese Zellen können daher mit weiteren Zellen mit „normaler“ MetRS ko-kultiviert und mit ANL markiert werden. Die markierten und aufgereinigten Sekretome können daraufhin differentiell den Zellen mit mutierter MetRS zugeordnet werden. Diese Methode wurde kürzlich in Anwesenheit von 10 % Serum bei einer Ko-Kultivierung von mesenchymen Stammzellen oder CHON-002 Zellen (mit MetRS) mit Makrophagen erfolgreich demonstriert und wäre auch eine interessante Variante für die Analyse des Tumorsekretoms in Anwesenheit von weiteren Zelltypen (Shin et al., 2022).

Eine zusätzliche, relativ neue Methode, um das Sekretom in Anwesenheit von Serum zu analysieren, basiert auf einer in der Regel genetisch modifizierten Biotin-Ligase, welche ihre

Substrate mit einem *biotin tag* versieht (Choi-Rhee et al., 2004). Dieses System (BioID) wird üblicherweise für die Analyse von proximitätsbasierten Interaktomen verwendet. Es stehen verschiedene optimierte Biotinligasen (BioID1+2, TurboID, miniTurbo) zur Verfügung, die als Fusionsproteine mit dem *protein of interest* (POI) exprimiert werden und schließlich in lebenden Zellen die Interaktionspartner des Fusionsproteins (in enger räumlicher Nähe) biotinylieren (Kim et al., 2014; Kim et al., 2016; Roux et al., 2012; Trinkle-Mulcahy, 2019). Werden die biotinylierten Proteine sekretiert, können sie mit diesem System über Streptavidin-Beads aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt werden. Mit diesen Ansätzen wurden, z.B. in transgenen Mäusen, Biotin-Ligasen spezifisch mit ER-residenten Faktoren verknüpft, um Proteine, welche über den klassischen, ER-abhängigen Sekretionsweg sekretiert werden, *in vivo* (in Geweben von Mausmodellen) für die nachfolgende Aufreinigung und Identifikation zu markieren (Kim et al., 2021; Liu et al., 2021d; Strack, 2021; Wei et al., 2021).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden die geschilderten Methoden relativ wenig genutzt, da die Anzahl an Publikationen mit diesen Techniken begrenzt erscheint. Offenbar hat sich im Feld der Sekretomanalysen noch kein standardisiertes Verfahren etabliert, da die einzelnen Markierungs- und Aufreinigungsverfahren unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen (Knecht et al., 2023).

Denkbar ist beispielsweise, dass die Zellen die Anwesenheit einer modifizierten Aminosäure im Rahmen der Qualitätskontrolle der Proteinbiosynthese erkennen und darauf reagieren. Hierzu gibt es neue Befunde in der Literatur (Kirschner et al., 2023).

In dieser Arbeit konnte ein klarer Vorteil von L-HPG gegenüber OPP und Puromycin gezeigt werden. Sowohl OPP als auch Puromycin induzieren eine frühzeitige Termination der Translation. Dies reduziert die Zellviabilität massiv, da proteomweit keine vollständigen Polypeptide mehr gebildet werden (Abb. 8.9; Abb. 8.10) (Aviner, 2020). Aus diesem Grund wird das Antibiotikum Puromycin schon lange als sehr effektives Selektionsreagenz mit schneller, starker und zelltyp-unabhängiger Toxizität für genetische modifizierte Zellen verwendet. Diese müssen zu diesem Zweck ein Puromycin inaktivierendes Enzym, die Puromycinacetyltransferase (PAC), koexprimieren (Aviner, 2020; Lacalle et al., 1989). OPP- und Puromycin eignen sich daher am besten für eine kurze, im Bereich von Minuten erfolgende globale und effektive Markierung des naszierenden Translatoms (Liu et al., 2012; Ravi et al., 2020), aber nicht für die Markierung von über mehrere Stunden sezernierten Proteinen. So gelang es in dieser Arbeit nicht, Sekretome mit OPP zu markieren und mittels Western Blot zu detektieren. Naszierende Proteine in Zellextrakten wurden jedoch problemlos detektiert (Abb. 8.9). Möglicherweise werden unvollständige Proteine nicht mehr effektiv sekretiert.

Unter Verwendung von L-HPG werden dagegen von den Zellen weiterhin vollständige und offenbar korrekt prozessierte Proteine synthetisiert, welche sekretiert und in

Zellkulturüberständen detektiert werden können. Zusätzlich ist eine L-HPG-Behandlung nur mit einer geringen Toxizität behaftet. Eine Markierung der Zellen mit L-HPG für 16 h führte zu einer Reduktion der Zellviabilität um 14%, während nach OPP- oder Puromycin-Behandlung 71% bzw. 50 % der Zellen eine reduzierte metabolische Aktivität und Zellvitalität aufwiesen (Abb. 8.10). Dieses Ergebnis stimmt mit einer älteren Analyse überein, nach der L-HPG ebenfalls keinen oder nur einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Zellviabilität hatte (Beatty et al., 2006). Da nur 1 % der Proteine einer Zelle kein Methionin enthalten, sind rein rechnerisch 99% des Proteoms über die L-HPG Analyse zugänglich (Dieterich et al., 2006; Zhang et al., 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass L-HPG markierte und sezernierte Proteine erfolgreich biotinyliert, quantitativ aufgereinigt und soweit angereichert werden konnten, dass die Detektion vieler weiterer Proteine nicht durch die immer noch kontaminierenden, hochabundanten bovinen Serumproteine kompromittiert oder maskiert wurde.

Die vergleichenden Analysen der Serum-freien zu den 1 % Serum Bedingungen resultierten nicht nur in einem technischen Vorteil, sondern auch in einer interessanten, inhaltlichen Beobachtung. Vor allem unter Serum-freien Bedingungen setzten die Zellen eine sehr große Anzahl an Proteinen frei, welche überwiegend zentralen intrazellulären und zytoplasmatischen Prozessen und *pathways* zugeordnet waren, wie z.B. dem Zellzyklus, der Translation oder dem RNA Metabolismus. Hierfür gab es zunächst zwei prinzipielle zwei Erklärungen. Entweder diese Proteine stammen aus dem erhöhten Anteil an apoptotischen oder nekrotischen Zellen (Knecht et al., 2023), der unter diesen Bedingungen auftrat, oder die Zellen setzen unter Serum-Entzug stressbedingt sehr viele zytoplasmatische Proteine über konventionelle und nicht-konventionelle Sekretionsmechanismen frei (Bhattacharya et al., 2014). Die Stressbedingung induziert eine sogenannte „sekretorische Autophagie“, bei der zytosolische Proteine ohne Signalsequenz über unkonventionelle Proteinsekretion abgegeben werden können (Ponpuak et al., 2015). Dieses erfolgt auch bei der Sekretion von prozessiertem IL-1 β und kann durch die Blockade der Autophagosomenbildung durch den PI3Kinase Inhibitor Wortmannin oder 3-Methyladenin blockiert werden (Harris et al., 2011; Zhang et al., 2015). Ein weiteres publiziertes Beispiel für ein intrazelluläres Protein ist das ribosomale Protein S3 (RPS3), welches von Tumorzellen (HT1080 Zellen) sekretiert wird (Kim et al., 2016). Auch in den hier erhobenen Daten wurde RPS3 detektiert. Denkbar ist auch, dass es zu einer Kombination beider Möglichkeiten kommt, die durch externe Trigger wie IL-1 modulierbar ist. Für letztere Hypothese spricht, dass das IL-1 regulierte Sekretom partiell, aber nicht komplett mit dem durch Serumentzug induzierbaren Sekretom überlappte.

Ein weiterer Aspekt ist, dass die intrazellulären bzw. zytoplasmatischen Proteine aus extrazellulären Vesikeln (EVs) oder Exosomen stammen könnten, welche differentiell und

stimulusabhängig entstehen. EVs fungieren als Vehikel, welche Membranproteine, intrazelluläre Proteine (sowohl aus dem Zytoplasma als auch aus dem Zellkern), Lipide und RNAs von Zelle zu Zelle transportieren (Cheng and Hill, 2022; Kalluri, 2016; Raposo and Stoorvogel, 2013). Exosomen werden als kleine Vesikel definiert, welche von der Zelle in die extrazelluläre Umgebung abgegeben werden und ausgewählte Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Glycokonjugate enthalten (Pegtel and Gould, 2019). Die in dieser Arbeit durchgeführte Fällung des Zellkulturüberstands ohne nachfolgende hochtourige Zentrifugation dürfte nicht dazu geführt haben, dass EVs oder Exosomen aus den Proben eliminiert wurden (Konoshenko et al., 2018; Zhang et al., 2023).

Die hier beobachtete differentielle Sekretion von intrazellulären Proteinen unter Stressbedingungen ist am ehesten vergleichbar mit den Ergebnissen einer neuen Studie in Makrophagen (Phulphagar et al., 2021). Humane oder murine Makrophagen wurden (i) lediglich mit LPS stimuliert, um die konventionelle Proteinsekretion zu aktivieren oder (ii) mit LPS und ATP oder Nigericin behandelt, um die unkonventionelle Sekretion zu aktivieren. Unter Einsatz der Metabolite Brefeldin A und Golgicide A, welche den Transport vom ER zum Golgi unterbrechen und somit den ER-Golgi-Sekretionsweg unterbinden (Chardin and McCormick, 1999; Saenz et al., 2009), wurde außerdem der unkonventionelle Sekretionsweg näher betrachtet. Geerntete Zellkulturüberstände wurden zentrifugiert und mit Urea denaturiert. Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass neben den bekannten Zytokinen und Alarminen auch tausende unkonventionell-freigesetzte Proteine mit diversen intrazellulären Funktionen detektiert wurden. Analysen beider Datensätze zeigten, dass 1447 von 1790 der in dieser Arbeit detektierten Proteine auch durch Phulphagar et al., detektiert wurden. Die detektierten intrazellulären Proteine könnten unerwartete extrazelluläre Funktionen besitzen (Hernandez et al., 2014; Jeffery, 1999). Eine nähere Betrachtung des unkonventionellen Sekretionswegs wäre daher zukünftig von großer Bedeutung.

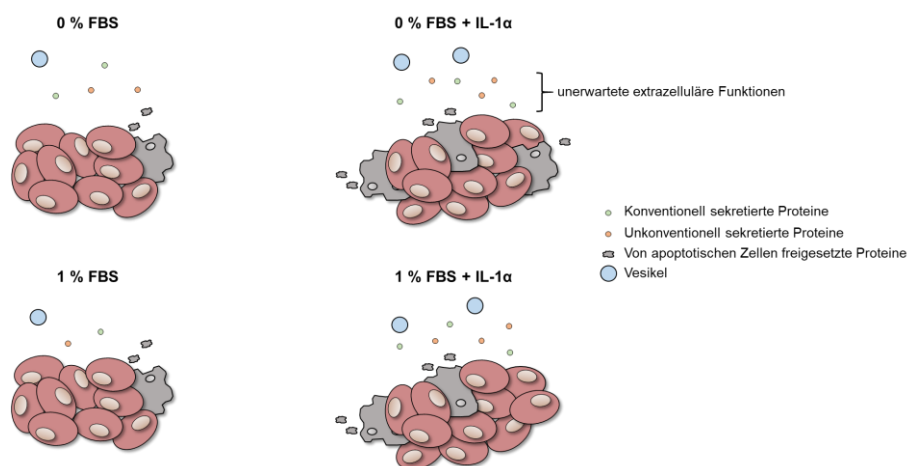


Abb. 5.2 Mögliche Herkunft der Proteine, welche nach erfolgter L-HPG Markierung detektiert werden.

Die L-HPG Markierung von Zellen erlaubt die Biotinylierung und Aufreinigung neu-synthetisierter Proteine, welche massenspektrometrisch untersucht werden können. Die Identifizierung des Sekretoms zeigte, dass viele intrazelluläre Proteine nach erfolgter L-HPG Markierung angereichert wurden. Es ist unklar, ob diese Proteine konventionell oder nicht-konventionell sekretiert wurden oder ob die Proteine überwiegend von apoptotischen Zellen freigesetzt wurden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die detektierten Proteine aus Vesikeln stammen. Nichtsdestotrotz zeigten die Ergebnisse, dass sowohl die IL-1 Stimulation als auch der Serumentzug zu einem veränderten, neu translatierten Sekretom führte. Dies ist auf die Stressbedingungen zurückzuführen.

In dieser Arbeit konnten lediglich vier Zytokine / Chemokine sporadisch nach erfolgter IL-1 Stimulation im Sekretom mittels LC-MS/MS detektiert werden, unter anderem CXCL3, welches auch in der Olink Analyse als eines der TOP20 IL-1 regulierten Proteine in iFTSECs+Leervektor identifiziert wurde. Die in ELISAs zuvor analysierten Proteine (IL8, CXCL2, CCL20, ICAM-1) wurden nicht detektiert. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass Zytokine durchaus mittels metabolischer Markierung und Massenspektrometrie detektierbar sind. So erlaubte die Kombination aus SILAC und AHA-Markierung beispielsweise die Detektion von TNF, IL-6 und IL-1 in mesenchymen Stammzellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von Serum (Shin et al., 2019). In einer der frühen Sekretomstudien mit LC-MS/MS Verfahren wiesen Meissner et al. Zytokine nach erfolgter LPS-Stimulation von Makrophagen im Sekretom nach. Hierbei wurden Zellkulturüberstände der Makrophagen, welche nicht metabolisch markiert waren, geerntet und mit Trypsin verdaut. Anschließend erfolgte die Identifikation per Massenspektrometrie. 364 von 775 sezernierten Proteinen wurde nach der LPS-Stimulation extrazellulären Funktionen zugeordnet. Zudem konnten 42 annotierte Zytokine gemessen werden (Meissner et al., 2013). Eine Weiterentwicklung bzw. Optimierung des hier etablierten Protokolls wäre somit von großer Bedeutung, um weitere Zytokine zu erfassen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine Methode inklusive eines bioinformatischen *workflows* etabliert, welche es erlaubt, Proteine aus den Überständen von IL-1 stimulierten Zellen nach erfolgter metabolischer Markierung in Anwesenheit von Serum zu detektieren. Der direkte Vergleich zu den häufig genutzten serum-freien Bedingungen zeigte starke Verschiebungen im Sekretommuster und führt zu der Beobachtung, dass Zellen unter Stressbedingungen sehr viele intrazelluläre Proteine abgeben. In zukünftigen Experimenten könnte untersucht werden, inwieweit dieses Phänomen reversibel ist (nach der erneuten Zugabe von Serum) oder den Übergang in den programmierten Zelltod oder in nekrotische Vorgänge markiert. Auch in diesem Fall wäre eine bessere molekulare Charakterisierung der Faktoren, welche von sterbenden Zellen abgegeben werden, mit der hier etablierten Methodik interessant. Auch diese Proteine könnten noch wichtige Signalfunktionen übernehmen, z.B. im entzündeten Gewebe und im Tumormikromilieu.

6 Fazit, Limitationen und Ausblick

CDK12 steuert die transkriptionelle Elongation über die Phosphorylierung der CTD. Dieser Elongations-modulierende Mechanismus und die Auswirkungen einer CDK12 Inaktivierung sind bereits umfassend beschrieben. Der Fokus der Arbeit lag daher auf der Identifizierung von pharmakologischen Phänotypen, die aufgrund einer CDK12 Inhibition oder Degradation auftreten. Dabei sollte der Fokus auf der IL-1 vermittelten Aktivierung von NF- κ B, der Genexpression und der Proteinsekretion liegen.

Die Ergebnisse bestätigen ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen Cyclin-abhängigen Kinasen (speziell CDK12/13) und dem kanonischen IL-1-NF- κ B Signalweg auf verschiedenen intrazellulären Ebenen, um die Genexpression und die Freisetzung von Proteinen zu steuern. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene CDK Inhibitoren differentielle Effekte auf die IL-1 induzierte Genexpression und die Proteinsekretion haben. (i) Der pan-CDK Inhibitor Flavopiridol supprimiert sowohl die CTD-Phosphorylierung und die Proliferation als auch die IL-1 induzierte Genexpression und Proteinsekretion vollständig. (ii) Der selektive CDK12/13 Inhibitor THZ531 hat einen differentiellen Effekt auf die IL-1 vermittelte Genexpression. Einige IL-1 Zielgene werden induziert, während die Expression anderer Zielgene stark supprimiert wird. (iii) Der PROTAC BSJ-4-116, welcher die proteasomale Degradation von CDK12/13 induziert, supprimiert die Expression und Sekretion der IL-1 Zielgene. Außerdem blockiert der PROTAC die Aktivierung von allen getesteten Komponenten des IL-1-NF- κ B Signalwegs. Allerdings sprechen die Ergebnisse für *off target* Effekte des PROTACs, welche einen Einsatz als Multikinase-Inhibitor ermöglichen könnten. (iv) Die spezifische Degradation von CDK12 und CDK13 über verschiedenen genetische Systeme hatte hingegen nur minimale Effekte auf den IL-1 Signalweg und die IL-1 induzierte Genexpression.

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass alle verwendeten Inhibitoren die Elongation, die Proliferation und die Zellviabilität supprimieren. Die Effekte auf die IL-1-NF- κ B vermittelte Genexpression und Sekretion unterscheidet sich allerdings immens. Die Ergebnisse lassen sich entweder durch *off target* Effekte oder durch nicht-kanonische Funktionen der Elongations-assoziierten CDKs erklären.

In Zukunft ist es wichtig, die transkriptionellen und translationalen Mechanismen der einzelnen Inhibitoren aufzuklären. Weitere Substrate von CDK12/13 in Zytokin-aktivierten Zellen sollten mittels Phospho-Proteomics identifiziert werden. Genomische Regionen, zu denen CDK12/13 rekrutiert werden, könnten mittels ChIPSeq analysiert werden. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die beobachteten komplexen zellulären Phänotypen durch einen globalen Elongationseffekt zu erklären sind. Neben der Regulierung der transkriptionellen Elongation ist anzunehmen, dass CDK12 zusätzlich eine wichtige Rolle beim (alternativen) Spleißen oder

dem RNA *turnover* bzw. der mRNA Halbwertszeit / Stabilität spielt. Die in der Literatur beschriebenen Effekte einer CDK12 Inaktivierung beziehen sich vor allem auf sehr lange Gene, welche viele Exons besitzen (Blazek et al., 2011; Pilarova et al., 2020). In dieser Arbeit wurden mit den inflammatorischen Genen hauptsächlich sehr kurze Gene betrachtet, so dass die Möglichkeit besteht, dass IL-1 induzierbare Gene einen nicht-kanonischen Transkriptionsweg nutzen. Dieser putative neue Mechanismus könnte z.B. mit den Phospho-Proteomics Ansätzen charakterisiert werden. Eine Limitation dieser Arbeit besteht in der ausschließlichen Verwendung von kultivierten Zelllinien. Daher wäre es zukünftig wichtig, die differentiellen Effekte der CDK Inhibitoren unter Verwendung von primären Zellen, Organoid-Modellen oder lebenden Präzisionschnitten aus Tumoren anhand der hier dargestellten Parameter weiter zu untersuchen, um die Effekte in einer realeren Tumorumgebung zu überprüfen.

Insgesamt zeigte die Arbeit, dass die Inhibition bzw. Depletion von CDKs mittels verschiedener Substanzen bzw. Systeme z.T. drastisch divergierende Phänotypen zur Folge hat. Während einige Ergebnisse die Erkenntnis stärken, dass CDK12 die transkriptionelle Elongation reguliert, deuten andere auf mögliche weitere, noch unbekannte (oder nicht kanonische) Funktionen von CDK12 in Zytokin-stimulierten Systemen hin.

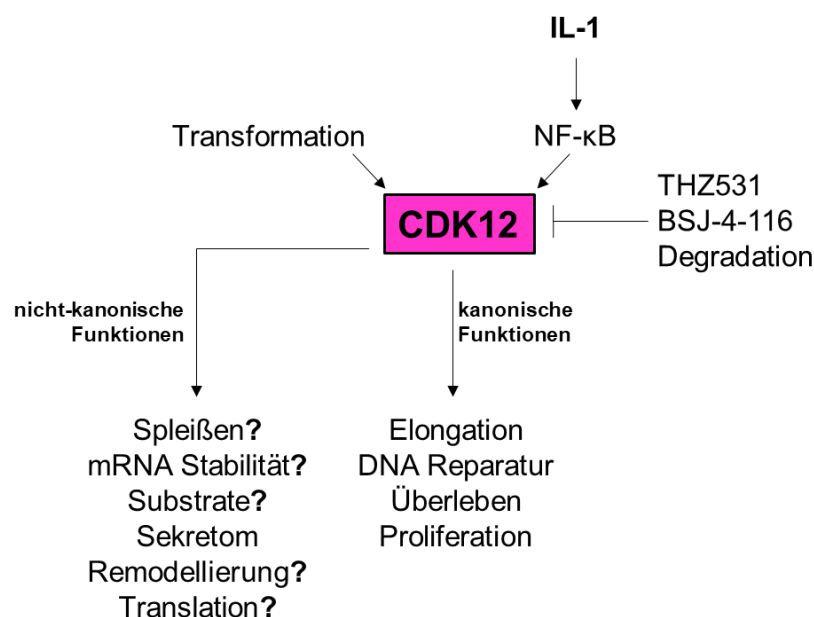


Abb. 6.1 Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse.

Eine schematische Darstellung zur Funktion von CDK12. Es ist Konsens in der Literatur, dass CDK12 eine zentrale Rolle bei der transkriptionellen Elongation spielt und diese reguliert. In dieser Arbeit wurde das Zusammenspiel zwischen CDK12 und dem IL-1-NF-κB Signalweg mittels verschiedener *loss of function* Ansätze in vier Tumorzellmodellen vergleichend untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die Evidenz für eine Rolle von CDK12 bei der P(Ser2)-RNA-Polymerase II abhängigen transkriptionellen Elongation. Allerdings lassen sich die komplexen Phänotypen nicht nur durch einen globalen Elongationseffekt erklären, sondern die Ergebnisse deuten auf weitere genregulatorische Funktionen von CDK12 hin, z.B. beim (alternativen) Spleißen, der mRNA Stabilität, der Translation und der Sekretion.

7 Literaturverzeichnis

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted Disruption of the MyD88 Gene Results in Loss of IL-1- and IL-18-Mediated Function. *Immunity* 9, 143-150.

Adams, P.D. (2001). Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta* 1471, 123-133.

Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Lebrun, M.H., Job, D., and Rakwal, R. (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10, 799-827.

Ahmadi, S.E., Rahimi, S., Zarandi, B., Chegeni, R., and Safa, M. (2021). MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *J Hematol Oncol* 14, 121.

Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of Serine 2 within the RNA Polymerase II C-Terminal Domain Couples Transcription and 3' End Processin. *Mol Cell* 13, 67-76.

Allen, B.L., and Taatjes, D.J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 155-166.

Altan-Bonnet, G., and Mukherjee, R. (2019). Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. *Nat Rev Immunol* 19, 205-217.

Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., and Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1b secretion: Implications for inflammatory processes. *PNAS* 101, 9745-9750.

Antonarakis, E.S., Isaacsson Velho, P., Fu, W., Wang, H., Agarwal, N., Sacristan Santos, V., Maughan, B.L., Pili, R., Adra, N., Sternberg, C.N., *et al.* (2020). CDK12-Altered Prostate Cancer: Clinical Features and Therapeutic Outcomes to Standard Systemic Therapies, Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors, and PD-1 Inhibitors. *JCO Precis Oncol* 4, 370-381.

Apte, R.N., and Voronov, E. (2017). Immunotherapeutic approaches of IL-1 neutralization in the tumor microenvironment. *J Leukoc Biol* 102, 293-306.

Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J., and Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of Ikb α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of Cell Science* 110, 369-378.

Arguello, F., Alexander, M., Sterry, J.A., Tudor, G., Smith, E.M., Kalavar, N.T., Greene, J.F., Koss, W., Morgan, C.D., Stinson, S.F., *et al.* (1998). Flavopiridol Induces Apoptosis of Normal Lymphoid Cells, Causes Immunosuppression, and Has Potent Antitumor Activity In Vivo Against Human Leukemia and Lymphoma Xenografts. *Blood* 91, 2482-2490.

Assarsson, E., Lundberg, M., Holmquist, G., Bjorkestén, J., Thorsen, S.B., Ekman, D., Eriksson, A., Rennel Dickens, E., Ohlsson, S., Edfeldt, G., *et al.* (2014). Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. *PLoS One* 9, e95192.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmborg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF κ B Activity Through Induction of I κ B synthesis. *Science* 270, 286-290.

Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., and Dinarello, C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci* 81, 7907-7911.

Aviner, R. (2020). The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Comput Struct Biotechnol J* 18, 1074-1083.

Bacher, S., Meier-Soelch, J., Kracht, M., and Schmitz, M.L. (2021). Regulation of Transcription Factor NF-kappaB in Its Natural Habitat: The Nucleus. *Cells* 10.

Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 307, 97-101.

- Bai, L., Zhou, H., Xu, R., Zhao, Y., Chinnaswamy, K., McEachern, D., Chen, J., Yang, C.Y., Liu, Z., Wang, M., *et al.* (2019). A Potent and Selective Small-Molecule Degradator of STAT3 Achieves Complete Tumor Regression In Vivo. *Cancer Cell* 36, 498-511 e417.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., and Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371, 199-204.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408, 297-315.
- Bajrami, I., Frankum, J.R., Konde, A., Miller, R.E., Rehman, F.L., Brough, R., Campbell, J., Sims, D., Rafiq, R., Hooper, S., *et al.* (2014). Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. *Cancer Res* 74, 287-297.
- Baluapuri, A., Wolf, E., and Eilers, M. (2020). Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 255-267.
- Bartkowiak, B., and Greenleaf, A.L. (2011). Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb? *Transcription* 2, 115-119.
- Bartkowiak, B., and Greenleaf, A.L. (2015). Expression, purification, and identification of associated proteins of the full-length hCDK12/CyclinK complex. *J Biol Chem* 290, 1786-1795.
- 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.
- Bartkowiak, B., Yan, C., and Greenleaf, A.L. (2015). Engineering an analog-sensitive CDK12 cell line using CRISPR/Cas. *Biochim Biophys Acta* 1849, 1179-1187.
- Baud, V., Liu, Z., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., and Karin, M. (1998). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes & Development* 13, 1297-1308.
- 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.
- Beatty, K.E., Liu, J.C., Xie, F., Dieterich, D.C., Schuman, E.M., Wang, Q., and Tirrell, D.A. (2006). Fluorescence visualization of newly synthesized proteins in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 7364-7367.
- Bekes, M., Langley, D.R., and Crews, C.M. (2022). PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov* 21, 181-200.
- Bensimon, A., Pizzagalli, M.D., Kartnig, F., Dvorak, V., Essletzbichler, P., Winter, G.E., and Superti-Furga, G. (2020). Targeted Degradation of SLC Transporters Reveals Amenability of Multi-Pass Transmembrane Proteins to Ligand-Induced Proteolysis. *Cell Chem Biol* 27, 728-739 e729.
- Bentley, D.L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet* 15, 163-175.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto jr, G.J., and Stryer, L. (2018). *Biochemie*, Vol 8. Auflage.
- Bhattacharya, A., Prakash, Y.S., and Eissa, N.T. (2014). Secretory function of autophagy in innate immune cells. *Cellular Microbiology* 16, 1637-1645.
- Bilusic, M., Heery, C.R., Collins, J.M., Donahue, R.N., Palena, C., Madan, R.A., Karzai, F., Marte, J.L., Strauss, J., Gatti-Mays, M.E., *et al.* (2019). Phase I trial of HuMax-IL8 (BMS-986253), an anti-IL-8 monoclonal antibody, in patients with metastatic or unresectable solid tumors. *J Immunother Cancer* 7, 240.
- Blagosklonny, M.V. (2004). Flavopiridol, an inhibitor of transcription: implications, problems and solutions. *Cell Cycle* 3, 1537-1542.
- Blazek, D., Kohoutek, J., Bartholomeeusen, K., Johansen, E., Hulinkova, P., Luo, Z., Cimerancic, 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 Dev* 25, 2158-2172.

- Bond, M.J., Chu, L., Nalawansa, D.A., Li, K., and Crews, C.M. (2020). Targeted Degradation of Oncogenic KRAS(G12C) by VHL-Recruiting PROTACs. *ACS Cent Sci* 6, 1367-1375.
- Boraschi, D., Italiani, P., Weil, S., and Martin, M.U. (2018). The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev* 281, 197-232.
- Bosken, 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. *Nat Commun* 5, 3505.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brikos, C., Wait, R., Begum, S., O'Neill, L.A., and Saklatvala, J. (2007). Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. *Mol Cell Proteomics* 6, 1551-1559.
- Briukhovetska, D., Dorr, J., Endres, S., Libby, P., Dinarello, C.A., and Kobold, S. (2021). Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer* 21, 481-499.
- Buccitelli, C., and Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet* 21, 630-644.
- Buhimschi, A.D., Armstrong, H.A., Toure, M., Jaime-Figueroa, S., Chen, T.L., Lehman, A.M., Woyach, J.A., Johnson, A.J., Byrd, J.C., and Crews, C.M. (2018). Targeting the C481S Ibrutinib-Resistance Mutation in Bruton's Tyrosine Kinase Using PROTAC-Mediated Degradation. *Biochemistry* 57, 3564-3575.
- Bui, T.M., Wiesolek, H.L., and Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol* 108, 787-799.
- Buratowski, S. (2000). Snapshots of RNA polymerase II transcription initiation. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 320-325.
- Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nature Structural Biology* 10, 679-680.
- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8, 671-682.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.
- Buss, H., Handschick, K., Jurrmann, N., Pekkonen, P., Beuerlein, K., Muller, H., Wait, R., Saklatvala, J., Ojala, P.M., Schmitz, M.L., et al. (2012). Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF-kappaB P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression. *PLoS One* 7, e51847.
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609-615.
- Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., and Yu, L. (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology* 14.
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., and Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 1, 493-502.
- Capece, D., Verzella, D., Tessitore, A., Alesse, E., Capalbo, C., and Zazzeroni, F. (2018). Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF-kappaB. *Semin Cell Dev Biol* 78, 51-61.
- Carmi, Y., Rinott, G., Dotan, S., Elkabets, M., Rider, P., Voronov, E., and Apte, R.N. (2011). Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis. *J Immunol* 186, 3462-3471.
- Casadio, R., Frigimelica, E., Bossu, P., Neumann, D., Martin, M.U., Tagliabue, A., and Boraschi, D. (2001). Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett* 499, 65-68.

- Cesari, E., Ciucci, A., Pieraccioli, M., Caggiano, C., Nero, C., Bonvissuto, D., Sillano, F., Buttarelli, M., Piermattei, A., Loverro, M., *et al.* (2023). Dual inhibition of CDK12 and CDK13 uncovers actionable vulnerabilities in patient-derived ovarian cancer organoids. *J Exp Clin Cancer Res* 42, 126.
- Chao, S.H., and Price, D.H. (2001). Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem* 276, 31793-31799.
- Chardin, P., and McCormick, F. (1999). Brefeldin A: The Advantage of Being Uncompetitive. *Cell* 97, 153-155.
- Chen, G., Chen, J., Liu, H., Chen, S., Zhang, Y., Li, P., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Mattes, W., Ning, B., *et al.* (2019). Comprehensive Identification and Characterization of Human Secretome Based on Integrative Proteomic and Transcriptomic Data. *Front Cell Dev Biol* 7, 299.
- Chen, G.Y., and Nunez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10, 826-837.
- 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. *Mol Cell Biol* 26, 2736-2745.
- Chen, H.H., Wong, Y.H., Geneviere, A.M., and Fann, M.J. (2007). CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 735-740.
- Chen, R., Keating, M.J., Gandhi, V., and Plunkett, W. (2005). Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 106, 2513-2519.
- Cheng, L., and Hill, A.F. (2022). Therapeutically harnessing extracellular vesicles. *Nat Rev Drug Discov* 21, 379-399.
- Cheng, L., Zhou, S., Shi, K., Cheng, Y., Cai, M., Ye, K., Lin, L., Zhang, Z., Jia, C., Xiang, H., *et al.* (2022). Dual inhibition of CDK12/CDK13 targets both tumor and immune cells in ovarian cancer. *Cancer Res* 82, 3588-3602.
- Cheng, S.W., Kuzyk, M.A., Moradian, A., Ichu, T.A., Chang, V.C., Tien, J.F., Vollett, S.E., Griffith, M., Marra, M.A., and Morin, G.B. (2012). Interaction of cyclin-dependent kinase 12/CrkRS with cyclin K1 is required for the phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 32, 4691-4704.
- Chirackal Manavalan, A.P., Pilarova, K., Kluge, M., Bartholomeeusen, K., Rajecky, M., Oppelt, J., Khirsariya, P., Paruch, K., Krejci, L., Friedel, C.C., *et al.* (2019). CDK12 controls G1/S progression by regulating RNAPII processivity at core DNA replication genes. *EMBO Rep* 20, e47592.
- Choi-Rhee, E., Schulman, H., and Cronan, J.E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Sci* 13, 3043-3050.
- Choi, S.H., Kim, S., and Jones, K.A. (2020). Gene expression regulation by CDK12: a versatile kinase in cancer with functions beyond CTD phosphorylation. *Exp Mol Med* 52, 762-771.
- Choi, S.H., Martinez, T.F., Kim, S., Donaldson, C., Shokhirev, M.N., Saghatelian, A., and Jones, K.A. (2019). CDK12 phosphorylates 4E-BP1 to enable mTORC1-dependent translation and mitotic genome stability. *Genes Dev* 33, 418-435.
- Chou, J., Quigley, D.A., Robinson, T.M., Feng, F.Y., and Ashworth, A. (2020). Transcription-Associated Cyclin-Dependent Kinases as Targets and Biomarkers for Cancer Therapy. *Cancer Discov* 10, 351-370.
- Cohen, P., Cross, D., and Janne, P.A. (2021). Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat Rev Drug Discov* 20, 551-569.
- Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1999). Transcription Elongation and Human Disease. *Annu Rev Biochem* 68, 301-319.
- Conaway, J.W., Shilatifard, A., Dvir, A., and Conaway, R.C. (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 25, 375-380.
- Conlon, K.C., Miljkovic, M.D., and Waldmann, T.A. (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res* 39, 6-21.

- Cortesi, L., Rugo, H.S., and Jackisch, C. (2021). An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Target Oncol* 16, 255-282.
- Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., and Cory, J.G. (1991). Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture. *Cancer Communications* 3, 207-212.
- Cramer, P. (2019). Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 573, 45-54.
- Crew, A.P., Raina, K., Dong, H., Qian, Y., Wang, J., Vigil, D., Serebrenik, Y.V., Hamman, B.D., Morgan, A., Ferraro, C., *et al.* (2018). Identification and Characterization of Von Hippel-Lindau-Recruiting Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) of TANK-Binding Kinase 1. *J Med Chem* 61, 583-598.
- Cromm, P.M., Samarasinghe, K.T.G., Hines, J., and Crews, C.M. (2018). Addressing Kinase-Independent Functions of Fak via PROTAC-Mediated Degradation. *J Am Chem Soc* 140, 17019-17026.
- da Cunha, B.R., Domingos, C., Stefanini, A.C.B., Henrique, T., Polachini, G.M., Castelo-Branco, P., and Tajara, E.H. (2019). Cellular Interactions in the Tumor Microenvironment: The Role of Secretome. *J Cancer* 10, 4574-4587.
- Davidson, L., Muniz, L., and West, S. (2014). 3' end formation of pre-mRNA and phosphorylation of Ser2 on the RNA polymerase II CTD are reciprocally coupled in human cells. *Genes Dev* 28, 342-356.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. (2000). Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* 103, 351-361.
- Deroo, B.J., and Archer, T.K. (2001). Glucocorticoid Receptor Activation of the I κ B Promoter within Chromatin. *Molecular Biology of the Cell* 12, 3365-3374.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441-445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., and Estelle, M. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 9, 109-119.
- Dharmasiri, N., and Estelle, M. (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci* 9, 302-308.
- DiDonato, J.A., Mercurio, F., and Karin, M. (2012). NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews* 246, 379-400.
- Diep, S., Maddukuri, M., Yamauchi, S., Geshow, G., and Delk, N.A. (2022). Interleukin-1 and Nuclear Factor Kappa B Signaling Promote Breast Cancer Progression and Treatment Resistance. *Cells* 11.
- Dieterich, D.C., Link, A.J., Graumann, J., Tirrell, D.A., and Schuman, E.M. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *PNAS* 103, 9482-9487.
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem* 86, 193-224.
- Dinarello, C.A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factors Reviews* 8, 253-265.
- Dinarello, C.A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-508.
- Dinarello, C.A. (2007). Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1, S34-45.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-550.
- Dinarello, C.A., Simon, A., and van der Meer, J.W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11, 633-652.

- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., and Cui, Q. (2020). The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 21.
- Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y.D., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2012). Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci* 17, 606-615.
- Dong, Y., Tu, R., Liu, H., and Qing, G. (2020). Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduct Target Ther* 5, 124.
- Dower, S.K., Kronheim, S.R., Hopp, T.P., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis, S., Henney, C.S., and Urdal, D.L. (1986). The cell surface receptors for interleukin-1a and interleukin-1b are identical *Nature* 324, 266-268.
- Dowling, P., and Clynes, M. (2011). Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics* 11, 794-804.
- Dreute, J. (2023). Synergistic targeting of ovarian cancer cells through simultaneous inhibition of key metabolic enzymes In Institut for Biochemistry (Justus Liebig University Giessen).
- Dubbury, S.J., Boutz, P.L., and Sharp, P.A. (2018). CDK12 regulates DNA repair genes by suppressing intronic polyadenylation. *Nature* 564, 141-145.
- Duffy, M.J., O'Grady, S., Tang, M., and Crown, J. (2021). MYC as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 94, 102154.
- Dyer, D.P. (2020). Understanding the mechanisms that facilitate specificity, not redundancy, of chemokine-mediated leukocyte recruitment. *Immunology* 160, 336-344.
- Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 859-868.
- Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24, 280-288.
- Eichelbaum, K., and Krijgsveld, J. (2014). Combining pulsed SILAC labeling and click-chemistry for quantitative secretome analysis. *Methods Mol Biol* 1174, 101-114.
- Eichelbaum, K., Winter, M., Berriel Diaz, M., Herzig, S., and Krijgsveld, J. (2012). Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat Biotechnol* 30, 984-990.
- Ekumi, K.M., Paculova, H., Lenasi, T., Pospichalova, V., Bosken, C.A., Rybarikova, J., Bryja, V., Geyer, M., Blazek, D., and Barboric, M. (2015). Ovarian carcinoma CDK12 mutations misregulate expression of DNA repair genes via deficient formation and function of the Cdk12/CycK complex. *Nucleic Acids Res* 43, 2575-2589.
- Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S., and Lima, C.D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 11, 1549-1561.
- Fan, Z., Devlin, J.R., Hogg, S.J., Doyle, M.A., Harrison, P.F., Todorovski, I., Cluse, L.A., Knight, D.A., Sandow, J.J., Gregory, G., et al. (2020). CDK13 cooperates with CDK12 to control global RNA polymerase II processivity. *Science Advances* 6.
- Filgueira de Azevedo, W., Mueller-Dieckmann, H., Schulze-Gahmen, U., Worland, P.J., Sausville, E.A., and Kim, S. (1996). Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Natl Acad Sci* 93, 2735-2740.
- Fisher, R.P. (2012). The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression. *Genes Cancer* 3, 731-738.
- Forester, C.M., Zhao, Q., Phillips, N.J., Urisman, A., Chalkley, R.J., Oses-Prieto, J.A., Zhang, L., Ruggero, D., and Burlingame, A.L. (2018). Revealing nascent proteomics in signaling pathways and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 2353-2358.
- Fousek, K., Horn, L.A., and Palena, C. (2021). Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol Ther* 219, 107692.
- Freissmuth, M., Offermanns, S., and Böhm, S. (2019). *Pharmakologie und Toxikologie Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, Vol 3. Auflage (Springer).

- Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human Cyclin A Is Required for Mitosis until Mid Prophase. *The Journal of Cell Biology* **147**, 295-306.
- Gaillard, H., Garcia-Muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* **15**, 276-289.
- Galderisi, U., Jori, F.P., and Giordano, A. (2003). Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* **22**, 5208-5219.
- Galdiero, M.R., Marone, G., and Mantovani, A. (2018). Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**.
- Gallorini, M., Cataldi, A., and di Giacomo, V. (2012). Cyclin-Dependent Kinase Modulators and Cancer Therapy. *Biodrugs* **26**, 377-391.
- Gao, X., III, H.A.B., Vuky, J., Dreicer, R., Sartor, A.O., Sternberg, C.N., Percent, I.J., Hussain, M.H.A., Kalebast, A.R., Shen, J., *et al.* (2022). Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *Journal of Clinical Oncology* **40**, 17-17.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**, 1003-1018.
- Geyer, P.E., Voytik, E., Treit, P.V., Doll, S., Kleinhempel, A., Niu, L., Muller, J.B., Buchholtz, M.L., Bader, J.M., Teupser, D., *et al.* (2019). Plasma Proteome Profiling to detect and avoid sample-related biases in biomarker studies. *EMBO Mol Med* **11**, e10427.
- Ghosh, G., and Adams, J.A. (2011). Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS J* **278**, 587-597.
- Gild, M.L., Tsang, V.H.M., Clifton-Bligh, R.J., and Robinson, B.G. (2021). Multikinase inhibitors in thyroid cancer: timing of targeted therapy. *Nat Rev Endocrinol* **17**, 225-234.
- Gottschlich, A., Endres, S., and Kobold, S. (2021). Therapeutic Strategies for Targeting IL-1 in Cancer. *Cancers (Basel)* **13**.
- Greber, B.J., Perez-Bertoldi, J.M., Lim, K., Iavarone, A.T., Toso, D.B., and Nogales, E. (2020). The cryoelectron microscopy structure of the human CDK-activating kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 22849-22857.
- Greenleaf, A.L. (2019). Human CDK12 and CDK13, multi-tasking CTD kinases for the new millenium. *Transcription* **10**, 91-110.
- Greifengberg, A.K., Honig, D., Pilarova, K., Duster, R., Bartholomeeusen, K., Bosken, C.A., Anand, K., Blazek, D., and Geyer, M. (2016). Structural and Functional Analysis of the Cdk13/Cyclin K Complex. *Cell Rep* **14**, 320-331.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S. (1999). NF- κ B Controls Cell Growth and Differentiation through Transcriptional Regulation of Cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 5785-5799.
- Hamilton, E.P., Schott, A.F., Nanda, R., Lu, H., Keung, C.F., Gedrich, R., Parameswaran, J., Han, H.S., and Hurvitz, S.A. (2022). ARV-471, an estrogen receptor (ER) PROTAC degrader, combined with palbociclib in advanced ER+/human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-) breast cancer: Phase 1b cohort (part C) of a phase 1/2 study. *Journal of Clinical Oncology* **40**, TPS1120-TPS1120.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Handschiek, K., Beuerlein, K., Jurida, L., Bartkuhn, M., Muller, H., Soelch, J., Weber, A., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Scharfe, M., *et al.* (2014). Cyclin-dependent kinase 6 is a chromatin-bound cofactor for NF- κ B-dependent gene expression. *Mol Cell* **53**, 193-208.
- Harada, A., Sekido, N., Akaoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* **56**, 559-564.
- Harlen, K.M., and Churchman, L.S. (2017). The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 263-273.

- Harmon, A.D., and Weiss, U. (1979). The structure of Rohitukine, the main alkaloid of *Amoora Rohituka*. *Tetrahedron Letters* 8, 721-724.
- Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S.G., O'Shea, A., Sharp, F.A., Lambe, E.M., Creagh, E.M., Golenbock, D.T., Tschopp, J., *et al.* (2011). Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *J Biol Chem* 286, 9587-9597.
- Hasan, N.M., Adams, G.E., and Joiner, M.C. (1999). Effect of serum starvation on expression and phosphorylation of PKC- ζ and p53 in V79 cells: Implications for cell death. *International Journal of Cancer* 80, 400-405.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Henry, K.L., Kellner, D., Bajrami, B., Anderson, J.E., Beyna, M., Bhisetti, G., Cameron, T., Capacci, A.G., Bertolotti-Ciarlet, A., Feng, J., *et al.* (2018). CDK12-mediated transcriptional regulation of noncanonical NF- κ B components is essential for signaling. *Science Signaling* 11.
- Hentze, M.W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 327-341.
- Hernandez, S., Ferragut, G., Amela, I., Perez-Pons, J., Pinol, J., Mozo-Villarias, A., Cedano, J., and Querol, E. (2014). MultitaskProtDB: a database of multitasking proteins. *Nucleic Acids Res* 42, D517-520.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M. (1999). NF- κ B Function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 Expression and G0/G1-to-S-Phase Transition. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2690-2698.
- Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716.
- Holtmann, H., Enninga, J., Kalble, S., Thiefes, A., Dorrie, A., Broemer, M., Winzen, R., Wilhelm, A., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., *et al.* (2001). The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem* 276, 3508-3516.
- Huovila, A.P., Turner, A.J., Peltto-Huikko, M., Karkkainen, I., and Ortiz, R.M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30, 413-422.
- Hwang, H.C., and Clurman, B.E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 24, 2776-2786.
- Iniguez, A.B., Stolte, B., Wang, E.J., Conway, A.S., Alexe, G., Dharia, N.V., Kwiatkowski, N., Zhang, T., Abraham, B.J., Mora, J., *et al.* (2018). EWS/FLI Confers Tumor Cell Synthetic Lethality to CDK12 Inhibition in Ewing Sarcoma. *Cancer Cell* 33, 202-216 e206.
- Jacopo, M. (2023). Unconventional protein secretion (UPS): role in important diseases. *Mol Biomed* 4, 2.
- Jao, C.Y., and Salic, A. (2008). Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *PNAS* 105, 15779-15784.
- Jasnovidova, O., and Stefl, R. (2013). The CTD code of RNA polymerase II: a structural view. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 1-16.
- Jeffery, C.J. (1999). Moonlighting proteins. *TIBS* 24, 8-11.
- 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.
- Jeronimo, C., Bataille, A.R., and Robert, F. (2013). The writers, readers, and functions of the RNA polymerase II C-terminal domain code. *Chem Rev* 113, 8491-8522.
- Jia, X., and Han, X. (2023). Targeting androgen receptor degradation with PROTACs from bench to bedside. *Biomed Pharmacother* 158, 114112.
- Jiang, B., Gao, Y., Che, J., Lu, W., Kaltheuner, I.H., Dries, R., Kalocsay, M., Berberich, M.J., Jiang, J., You, I., *et al.* (2021). Discovery and resistance mechanism of a selective CDK12 degrader. *Nat Chem Biol* 17, 675-683.

- Joshi, P.M., Sutor, S.L., Huntoon, C.J., and Karnitz, L.M. (2014). Ovarian cancer-associated mutations disable catalytic activity of CDK12, a kinase that promotes homologous recombination repair and resistance to cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *J Biol Chem* 289, 9247-9253.
- Jurida, L., Soelch, J., Bartkuhn, M., Handschick, K., Muller, H., Newel, D., Weber, A., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Bhujju, S., *et al.* (2015). The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF-kappaB p65. *Cell Rep* 10, 726-739.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 126, 1208-1215.
- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., and Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen* 39, 12.
- Karst, A.M., Levanon, K., and Drapkin, R. (2011). Modeling high-grade serous ovarian carcinogenesis from the fallopian tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7547-7552.
- Kaur, G., Stetler-Stevenson, M., Sebers, S., Worland, P., Sedlacek, H., Myers, C., Czech, J., Naik, R., and Sausville, E. (1992). Growth Inhibition With Reversible Cell Cycle Arrest of Carcinoma Cells by Flavone L86-8275. *Journal of National Cancer Institute* 84, 1736-1740.
- Kelland, L.R. (2000). Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 2903-2911.
- Keller, M., Ruegg, A., Werner, S., and Beer, H.D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818-831.
- Kim, D.I., Birendra, K.C., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., and Roux, K.J. (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2453-2461.
- Kim, J., Gee, H.Y., and Lee, M.G. (2018). Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *J Cell Sci* 131.
- Kim, K.E., Park, I., Kim, J., Kang, M.G., Choi, W.G., Shin, H., Kim, J.S., Rhee, H.W., and Suh, J.M. (2021). Dynamic tracking and identification of tissue-specific secretory proteins in the circulation of live mice. *Nat Commun* 12, 5204.
- Kim, Y., Lee, M.S., Kim, H.D., and Kim, J. (2016). Ribosomal protein S3 (rpS3) secreted from various cancer cells is N-linked glycosylated. *Oncotarget* 7, 80350-80362.
- Kirschner, F., Arnold-Schild, D., Leps, C., Lacki, M.K., Klein, M., Chen, Y., Ludt, A., Marini, F., Kucuk, C., Stein, L., *et al.* (2023). Modulation of cellular transcriptome and proteome composition by azidohomoalanine-implications on click chemistry-based secretome analysis. *J Mol Med (Berl)* 101, 855-867.
- Knecht, S., Eberl, H.C., Kreisz, N., Ugwu, U.J., Starikova, T., Kuster, B., and Wilhelm, S. (2023). An introduction to analytical challenges, approaches and applications in mass-spectrometry-based secretomics. *Mol Cell Proteomics*, 100636.
- 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.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the Domains in Cyclin A Required for Binding to, and Activation of, p34cdC2 and p32cdk2 Protein Kinase Subunits. *Molecular Biology of the Cell* 3, 1279-1294.
- Kohoutek, J., and Blazek, D. (2012). Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13. *Cell Div* 7.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14, 2452-2460.
- Konoshenko, M.Y., Lekchnov, E.A., Vlassov, A.V., and Laktionov, P.P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int* 2018, 8545347.
- Kracht, M., Muller-Ladner, U., and Schmitz, M.L. (2020). Mutual regulation of metabolic processes and proinflammatory NF-kappaB signaling. *J Allergy Clin Immunol* 146, 694-705.

- Krajewska, M., Dries, R., Grasseti, A.V., Dust, S., Gao, Y., Huang, H., Sharma, B., Day, D.S., Kwiatkowski, N., Pomaville, M., *et al.* (2019). CDK12 loss in cancer cells affects DNA damage response genes through premature cleavage and polyadenylation. *Nat Commun* 10, 1757.
- Krystof, V., Baumli, S., and Fürst, R. (2012). Perspective of Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a Drug Target. *Current Pharmaceutical Design* 18, 2883-2890.
- Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y., and Gelinas, C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8961-8982.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30, 16-34.
- Kuo, L.J., and Yang, L. (2008). γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *in vivo* 22, 305-301.
- Kwapisz, D. (2017). Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast Cancer Res Treat* 166, 41-54.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 92, 689-737.
- Labidi-Galy, S.I., Papp, E., Hallberg, D., Niknafs, N., Adleff, V., Noe, M., Bhattacharya, R., Novak, M., Jones, S., Phallen, J., *et al.* (2017). High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun* 8, 1093.
- Lacalle, R.A., Pulido, D., Vara, J., Zalacain, M., and Jimenez, A. (1989). Molecular analysis of the pat gene encoding a puromycin N-acetyl transferase from *Streptomyces alboniger* Gene 79, 375-380.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lalle, G., Twardowski, J., and Grinberg-Bleyer, Y. (2021). NF-kappaB in Cancer Immunity: Friend or Foe? *Cells* 10.
- 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.
- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 87-123.
- Levin, V.A., Panchabhai, S.C., Shen, L., Kornblau, S.M., Qiu, Y., and Baggerly, K.A. (2010). Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines. *J Proteome Res* 9, 179-191.
- Li, Y., Zhang, H., Li, Q., Zou, P., Huang, X., Wu, C., and Tan, L. (2020). CDK12/13 inhibition induces immunogenic cell death and enhances anti-PD-1 anticancer activity in breast cancer. *Cancer Lett* 495, 12-21.
- Liang, K., Gao, X., Gilmore, J.M., Florens, L., Washburn, M.P., Smith, E., and Shilatifard, A. (2015). Characterization of human cyclin-dependent kinase 12 (CDK12) and CDK13 complexes in C-terminal domain phosphorylation, gene transcription, and RNA processing. *Mol Cell Biol* 35, 928-938.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079-3093.
- Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H.A., and Liu, G. (2021a). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh)* 8, e2004433.
- Liu, H., Liu, K., and Dong, Z. (2021b). Targeting CDK12 for Cancer Therapy: Function, Mechanism, and Drug Discovery. *Cancer Res* 81, 18-26.
- Liu, H., Zhao, Q., Tan, L., Wu, X., Huang, R., Zuo, Y., Chen, L., Yang, J., Zhang, Z.X., Ruan, W., *et al.* (2023). Neutralizing IL-8 potentiates immune checkpoint blockade efficacy for glioma. *Cancer Cell*.
- Liu, J., Chen, H., Kaniskan, H.U., Xie, L., Chen, X., Jin, J., and Wei, W. (2021c). TF-PROTACs Enable Targeted Degradation of Transcription Factors. *J Am Chem Soc* 143, 8902-8910.

- Liu, J., Jang, J.Y., Pirooznia, M., Liu, S., and Finkel, T. (2021d). The secretome mouse provides a genetic platform to delineate tissue-specific in vivo secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**.
- Liu, J., Xu, Y., Stoleru, D., and Salic, A. (2012). Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 413-418.
- Liu, Q., Li, A., Tian, Y., Wu, J.D., Liu, Y., Li, T., Chen, Y., Han, X., and Wu, K. (2016). The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **31**, 61-71.
- Lopez-Girona, A., Mendy, D., Ito, T., Miller, K., Gandhi, A.K., Kang, J., Karasawa, S., Carmel, G., Jackson, P., Abbasian, M., *et al.* (2012). Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* **26**, 2326-2335.
- Lorenz, M., Fritsche-Guenther, R., Bartsch, C., Vietzke, A., Eisenberger, A., Stangl, K., Stangl, V., and Kirwan, J.A. (2023). Serum Starvation Accelerates Intracellular Metabolism in Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* **24**.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550.
- Lugowski, A., Nicholson, B., and Rissland, O.S. (2018). Determining mRNA half-lives on a transcriptome-wide scale. *Methods* **137**, 90-98.
- Lui, G.Y.L., Grandori, C., and Kemp, C.J. (2018). CDK12: an emerging therapeutic target for cancer. *J Clin Pathol* **71**, 957-962.
- Lukasik, P., Zaluski, M., and Gutowska, I. (2021). Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development-Review. *Int J Mol Sci* **22**.
- Madden, E.C., Gorman, A.M., Logue, S.E., and Samali, A. (2020). Tumour Cell Secretome in Chemoresistance and Tumour Recurrence. *Trends Cancer* **6**, 489-505.
- Magnuson, B., Bedi, K., Narayanan, I.V., Bartkowiak, B., Blinkiewicz, H., Paulsen, M.T., Greenleaf, A., and Ljungman, M. (2022). CDK12 regulates co-transcriptional splicing and RNA turnover in human cells. *iScience* **25**, 105030.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* **15**.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews* **1**, 222-231.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630-641.
- 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.
- Mansouri, S., Heylmann, D., Stiewe, T., Kracht, M., and Savai, R. (2022). Cancer genome and tumor microenvironment: Reciprocal crosstalk shapes lung cancer plasticity. *Elife* **11**.
- Mantovani, A., Barajon, I., and Garlanda, C. (2018). IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev* **281**, 57-61.
- Mantovani, A., Dinarello, C.A., Molgora, M., and Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity* **50**, 778-795.
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., *et al.* (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs *Nature* **315**, 641-647.
- Matthews, H.K., Bertoli, C., and de Bruin, R.A.M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 74-88.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997). The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* **91**.
- Meier-Soelch, J., Mayr-Buro, C., Juli, J., Leib, L., Linne, U., Dreute, J., Papantonis, A., Schmitz, M.L., and Kracht, M. (2021). Monitoring the Levels of Cellular NF-kappaB Activation States. *Cancers (Basel)* **13**.

- Meissner, F., Scheltema, R.A., Mollenkopf, H., and Mann, M. (2013). Direct Proteomic Quantification of the Secretome of Activated Immune Cells. *Science* **340**, 475-478.
- Meldal, M., and Wenzel Tornøe, C. (2008). Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem Rev* **108**, 2952-3015.
- 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.
- Murphy, C.G., and Dickler, M.N. (2015). The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer. *Oncologist* **20**, 483-490.
- Nalawansha, D.A., and Crews, C.M. (2020). PROTACs: An Emerging Therapeutic Modality in Precision Medicine. *Cell Chem Biol* **27**, 998-1014.
- Natoli, G., Sacconi, S., Bosisio, D., and Marazzi, I. (2005). Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat Immunol* **6**, 439-445.
- Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y., and Kanemaki, M.T. (2016). Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. *Cell Rep* **15**, 210-218.
- Negus, R.P.M., and Balkwill, F.R. (1996). Cytokines in tumour growth, migration and metastasis. *World J Urol* **14**, 157-165.
- Newcomb, E.W. (2004). Flavopiridol: pleiotropic biological effects enhance its anti-cancer activity. *Anticancer Drugs* **15**, 411-419.
- Nickel, W., and Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 148-155.
- Niu, L., Geyer, P.E., Wewer Albrechtsen, N.J., Gluud, L.L., Santos, A., Doll, S., Treit, P.V., Holst, J.J., Knop, F.K., Vilsboll, T., *et al.* (2019). Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Syst Biol* **15**, e8793.
- Niu, T., Li, K., Jiang, L., Zhou, Z., Hong, J., Chen, X., Dong, X., He, Q., Cao, J., Yang, B., *et al.* (2022). Noncovalent CDK12/13 dual inhibitors-based PROTACs degrade CDK12-Cyclin K complex and induce synthetic lethality with PARP inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry* **228**.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal Cell Cycles and their Control. *Annu Rev Biochem* **61**, 441-470.
- Nugent, J.H.A., Alfa, C.E., Young, T., and Hyams, J.S. (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *Journal of Cell Science* **99**, 669-674.
- Nurk, S., Koren, S., Rhie, A., Rautiainen, M., Bizikadze, A.V., Mikheenko, A., Vollger, M.R., Altemose, N., Uralsky, L., Gershman, A., *et al.* (2022). The complete sequence of a human genome. *Science* **376**, 44-53.
- Ocana, A., and Pandiella, A. (2020). Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res* **39**, 189.
- Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000034.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M., and Pagano, M. (1995). Human Cyclin E, a Nuclear Protein Essential for the G1-to-S Phase Transition. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 2612-2624.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G., and Murcia, J.M. (1998). Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* **273**, 33533-33539.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376-386.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & Development* **10**, 2657-2683.

- Oya, N., Zolzer, F., Werner, F., and Streffer, C. (2003). Effects of serum starvation on radiosensitivity, proliferation and apoptosis in four human tumor cell lines with different p53 status. *Strahlenther Onkol* 179, 99-106.
- Padgaonkar, M., Shendre, S., Chatterjee, P., and Banerjee, S. (2023). Cancer secretome: finding out hidden messages in extracellular secretions. *Clin Transl Oncol* 25, 1145-1155.
- Palozola, K.C., Donahue, G., and Zaret, K.S. (2021). EU-RNA-seq for in vivo labeling and high throughput sequencing of nascent transcripts. *STAR Protoc* 2, 100651.
- Paltridge, J.L., Belle, L., and Khew-Goodall, Y. (2013). The secretome in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1834, 2233-2241.
- Panagiotou, E., Gomatou, G., Trontzas, I.P., Syrigos, N., and Kotteas, E. (2022). Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors in solid tumors: a review of clinical trials. *Clin Transl Oncol* 24, 161-192.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12, 252-264.
- Parker, B.W., Kaur, G., Nieves-Neira, W., Taimi, M., Kohlhagen, G., Shimizu, T., Losiewicz, M.D., Pommier, Y., Sausville, E.A., and Senderowicz, A.M. (1998). Early Induction of Apoptosis in Hematopoietic Cell Lines After Exposure to Flavopiridol. *Blood* 91, 458-465.
- Parker, C.G., and Pratt, M.R. (2020). Click Chemistry in Proteomic Investigations. *Cell* 180, 605-632.
- Patel, V., Senderowicz, A.M., Pinto, D., Igishi, T., Raffeld, M., Quintanilla-Martinez, L., Ensley, J.F., Sausville, E.A., and Gutkind, J.S. (1998). Flavopiridol, a Novel Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas by Inducing Apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* 102, 1674-1681.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821-828.
- Pavlou, M.P., and Diamandis, E.P. (2010). The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? *J Proteomics* 73, 1896-1906.
- Pegtel, D.M., and Gould, S.J. (2019). Exosomes. *Annu Rev Biochem* 88, 487-514.
- Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23, 297-305.
- Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J., and Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* 18, 396-410.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.
- Phulphagar, K., Kuhn, L.I., Ebner, S., Frauenstein, A., Swietlik, J.J., Rieckmann, J., and Meissner, F. (2021). Proteomics reveals distinct mechanisms regulating the release of cytokines and alarmins during pyroptosis. *Cell Rep* 34, 108826.
- Pilarova, K., Herudek, J., and Blazek, D. (2020). CDK12: cellular functions and therapeutic potential of versatile player in cancer. *NAR Cancer* 2, zcaa003.
- Pirkmajer, S., and Chibalin, A.V. (2011). Serum starvation: caveat emptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C272-279.
- Ponpuak, M., Mandell, M.A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C., and Deretic, V. (2015). Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 35, 106-116.
- Pope, S.D., and Medzhitov, R. (2018). Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Mol Cell* 71, 389-397.
- Popova, T., Manie, E., Boeva, V., Battistella, A., Goundiam, O., Smith, N.K., Mueller, C.R., Raynal, V., Mariani, O., Sastre-Garau, X., *et al.* (2016). Ovarian Cancers Harboring Inactivating Mutations in CDK12 Display a Distinct Genomic Instability Pattern Characterized by Large Tandem Duplications. *Cancer Res* 76, 1882-1891.

- Prescott, J.A., Mitchell, J.P., and Cook, S.J. (2021). Inhibitory feedback control of NF-kappaB signalling in health and disease. *Biochem J* 478, 2619-2664.
- Pretre, V., Papadopoulos, D., Regard, J., Pelletier, M., and Woo, J. (2022). Interleukin-1 (IL-1) and the inflammasome in cancer. *Cytokine* 153, 155850.
- Priester, J., Dreute, J., Kracht, M., and Schmitz, M.L. (2022). Post-Transcriptional Control of mRNA Metabolism and Protein Secretion: The Third Level of Regulation within the NF-kappaB System. *Biomedicines* 10.
- Priester, J., Meier-Soelch, J., Weiser, H., Heylmann, D., Weber, A., Linne, U., and Kracht, M. (2023). Metabolic labeling and LC-MS/MS-based identification of interleukin-1alpha-induced secreted proteomes from epithelial cells in the presence or absence of serum. *STAR Protoc* 4, 102195.
- Proud, C.G. (2001). Regulation of mRNA translation. *Essays Biochem* 37, 97-108.
- Qi, S.M., Dong, J., Xu, Z.Y., Cheng, X.D., Zhang, W.D., and Qin, J.J. (2021). PROTAC: An Effective Targeted Protein Degradation Strategy for Cancer Therapy. *Front Pharmacol* 12, 692574.
- Qiu, M., Yin, Z., Wang, H., Lei, L., Li, C., Cui, Y., Dai, R., Yang, P., Xiang, Y., Li, Q., *et al.* (2023). CDK12 and Integrator-PP2A complex modulates LEO1 phosphorylation for processive transcription elongation. *Science Advances* 9.
- Qiu, Y., Su, M., Liu, L., Tang, Y., Pan, Y., and Sun, J. (2021). Clinical Application of Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Drug Des Devel Ther* 15, 2269-2287.
- Quereda, V., Bayle, S., Vena, F., Frydman, S.M., Monastyrskyi, A., Roush, W.R., and Duckett, D.R. (2019). Therapeutic Targeting of CDK12/CDK13 in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell* 36, 545-558 e547.
- Ramazi, S., and Zahiri, J. (2021). Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford)* 2021.
- Ramos, J.A., Zenser, N., Leyser, O., and Callis, J. (2011). Rapid Degradation of Auxin/Indoleacetic Acid Proteins Requires Conserved Amino Acids of Domain II and Is Proteasome Dependent. *The Plant Cell* 13, 2349-2360.
- Rana, S., Bendjennat, M., Kour, S., King, H.M., Kizhake, S., Zahid, M., and Natarajan, A. (2019). Selective degradation of CDK6 by a palbociclib based PROTAC. *Bioorg Med Chem Lett* 29, 1375-1379.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373-383.
- Rashid, M.U., and Coombs, K.M. (2019). Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *J Cell Physiol* 234, 7718-7724.
- Ravi, V., Jain, A., Mishra, S., and Sundaresan, N.R. (2020). Measuring Protein Synthesis in Cultured Cells and Mouse Tissues Using the Non-radioactive SUNSET Assay. *Curr Protoc Mol Biol* 133, e127.
- Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2020). Interleukin-1beta and Cancer. *Cancers (Basel)* 12.
- Richard, P., and Manley, J.L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev* 23, 1247-1269.
- Riedlinger, T., Haas, J., Busch, J., van de Sluis, B., Kracht, M., and Schmitz, M.L. (2018). The Direct and Indirect Roles of NF-kappaB in Cancer: Lessons from Oncogenic Fusion Proteins and Knock-in Mice. *Biomedicines* 6.
- Ritchie, S., Reed, D.A., Pereira, B.A., and Timpson, P. (2021). The cancer cell secretome drives cooperative manipulation of the tumour microenvironment to accelerate tumourigenesis. *Fac Rev* 10, 4.
- Robinson, J.L., Feizi, A., Uhlen, M., and Nielsen, J. (2019). A Systematic Investigation of the Malignant Functions and Diagnostic Potential of the Cancer Secretome. *Cell Rep* 26, 2622-2635 e2625.
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., and Sharpless, K.B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 2596-2599.

- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998). IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 395, 297-300.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 196, 801-810.
- Royal Swedish Academy of Sciences, N. (2022). The Nobel Prize in Chemistry 2022. In Press Release.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., and Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *The EMBO Journal* 9, 1503-1510.
- Russo, R.C., Garcia, C.C., Teixeira, M.M., and Amaral, F.A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 10, 593-619.
- Sachs, S., Niu, L., Geyer, P., Jall, S., Kleinert, M., Feuchtinger, A., Stemmer, K., Brielmeier, M., Finan, B., DiMarchi, R.D., *et al.* (2021). Plasma proteome profiles treatment efficacy of incretin dual agonism in diet-induced obese female and male mice. *Diabetes Obes Metab* 23, 195-207.
- Saenz, J.B., Sun, W.J., Chang, J.W., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N.S., and Haslam, D.B. (2009). Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nat Chem Biol* 5, 157-165.
- Sakamoto, K.M., Kim, K.B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C.M., and Deshaies, R.J. (2001). Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation. *PNAS*, 8554-8559.
- Saleh, A.M., Wilding, K.M., Calve, S., Bundy, B.C., and Kinzer-Ursem, T.L. (2019). Non-canonical amino acid labeling in proteomics and biotechnology. *J Biol Eng* 13, 43.
- Satyanarayana, A., and Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28, 2925-2939.
- Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 557-567.
- Schafer, K.A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol* 35, 461-478.
- Schmitz, M.L., Weber, A., Roxlau, T., Gaestel, M., and Kracht, M. (2011). Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1813, 2165-2175.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6, 209-217.
- Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-2440.
- Sedlacek, H., Czech, J., Naik, R., Kaur, G., Worland, P., Losiewicz, M., Parker, B., Carlson, B., Smith, A., Senderowicz, A., *et al.* (1996). Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *International Journal of Oncology* 9, 1143-1168.
- Sedlacek, H.H. (2001). Mechanisms of action of flavopiridol. *Critical Reviews in Oncology* 38, 139-170.
- Senderowicz, A.M. (1999). Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Investigational New Drugs* 17, 313-320.
- Sentfitleben, W., Y, C., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S., and Karin, M. (2001). Activation by IKK α of a Second, Evolutionary Conserved, NF- κ B Signaling Pathway. *Science* 293, 1495-1499.
- Serizawa, H., Mäkelä, 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.
- Shembade, N., and Harhaj, E.W. (2012). Regulation of NF- κ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell Mol Immunol* 9, 123-130.

- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases *Genes & Development* 9, 1149-1163.
- Shin, J., Hong, S., Lee, S., Kim, T., Park, I., An, S., Lee, W., Lim, J., Kim, K., Yang, Y., *et al.* (2008). Serum starvation induces G1 arrest through suppression of skp2-CDK2 and CDK4 in SK-OV-3 cells. *International Journal of Oncology* 32, 435-439.
- Shin, J., Rhim, J., Kwon, Y., Choi, S.Y., Shin, S., Ha, C.W., and Lee, C. (2019). Comparative analysis of differentially secreted proteins in serum-free and serum-containing media by using BONCAT and pulsed SILAC. *Sci Rep* 9, 3096.
- Shin, S., Lee, S., Choi, S., Park, N., Kwon, Y., Jeong, J., Ju, S., Chang, Y., Park, K., Ha, C., *et al.* (2022). Characterization of the Secretome of a Specific Cell Expressing Mutant Methionyl-tRNA Synthetase in Co-Culture Using Click Chemistry. *Int J Mol Sci* 23.
- Shyamsunder, P., Sridharan, S.P., Madan, V., Dakle, P., Zeya, C., Kanojia, D., Chng, W.J., Ong, S.T., and Koeffler, H.P. (2022). THZ531 Induces a State of BRCAness in Multiple Myeloma Cells: Synthetic Lethality with Combination Treatment of THZ 531 with DNA Repair Inhibitors. *Int J Mol Sci* 23.
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J.P., Patil, P.B., Thakkannavar, S.S., and Pujari, V.B. (2019). Inflammation and Cancer. *Ann Afr Med* 18, 121-126.
- Smale, S.T. (2012). Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- κ B family of transcription factors. *Immunol Rev* 246, 193-204.
- Song, P., Kwon, Y., Joo, J.Y., Kim, D.G., and Yoon, J.H. (2019). Secretomics to Discover Regulators in Diseases. *Int J Mol Sci* 20.
- Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A., Jr., and Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 12, 27-41.
- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 447-458.
- Stanley, A.C., and Lacy, P. (2010). Pathways for cytokine secretion. *Physiology (Bethesda)* 25, 218-229.
- Stastna, M., and Van Eyk, J.E. (2012). Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *Proteomics* 12, 722-735.
- Stenzen, J.A., and Poschenrieder, A.J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Anal Chim Acta* 853, 95-115.
- Strack, R. (2021). Revealing the secretome. *Nat Methods* 18, 1273.
- Sun, S., Granchi, P.A., Ballard, D.W., and Greene, W.C. (1993). NF- κ B Controls Expression of Inhibitor I κ B α : Evidence for an Inducible Autoregulatory Pathway. *Science* 259, 1912-1915.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., *et al.* (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750-754.
- Takada, Y., and Aggarwal, B.B. (2004). Flavopiridol inhibits NF- κ B activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclin D1, cyclooxygenase-2, and matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 279, 4750-4759.
- Taniguchi, K., and Karin, M. (2018). NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 18, 309-324.
- Tanzer, M.C., Bludau, I., Stafford, C.A., Hornung, V., and Mann, M. (2021). Phosphoproteome profiling uncovers a key role for CDKs in TNF signaling. *Nat Commun* 12, 6053.
- Tellier, M., Zaborowska, J., Caizzi, L., Mohammad, E., Velychko, T., Schwalb, B., Ferrer-Vicens, I., Blears, D., Nojima, T., Cramer, P., *et al.* (2020). CDK12 globally stimulates RNA polymerase II transcription elongation and carboxyl-terminal domain phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 48, 7712-7727.

- Tien, J.F., Mazloomian, A., Cheng, S.G., Hughes, C.S., Chow, C.C.T., Canapi, L.T., Oloumi, A., Trigo-Gonzalez, G., Bashashati, A., Xu, J., *et al.* (2017). CDK12 regulates alternative last exon mRNA splicing and promotes breast cancer cell invasion. *Nucleic Acids Res* 45, 6698-6716.
- Timmers, H.T.M., and Tora, L. (2018). Transcript Buffering: A Balancing Act between mRNA Synthesis and mRNA Degradation. *Molecular Cell* 72, 10-17.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., *et al.* (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 207-233.
- Tornøe, C.W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem* 67, 3057-3064.
- Traganos, F. (2014). Cycling without Cyclins. *Cell Cycle* 3, 31-33.
- Trinkle-Mulcahy, L. (2019). Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping. *F1000Research* 8.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2563-2582.
- Tyanova, S., and Cox, J. (2018). Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. *Methods Mol Biol* 1711, 133-148.
- Uhlen, M., Karlsson, M.J., Hober, A., Svensson, A., Scheffel, J., Kotol, D., Zhong, W., Tebani, A., Strandberg, L., Edfors, F., *et al.* (2019). The human secretome. *Science Signaling* 12.
- Urabe, F., Kosaka, N., Ito, K., Kimura, T., Egawa, S., and Ochiya, T. (2020). Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 318, C29-C39.
- van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213-228.
- Verma, R., Mohl, D., and Deshaies, R.J. (2020). Harnessing the Power of Proteolysis for Targeted Protein Inactivation. *Mol Cell* 77, 446-460.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-149.
- Viotti, C. (2016). ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. *Methods Mol Biol* 1459, 3-29.
- Wang, B., Guo, H., Yu, H., Chen, Y., Xu, H., and Zhao, G. (2021). The Role of the Transcription Factor EGR1 in Cancer. *Front Oncol* 11, 642547.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling* 3.
- Wei, W., Riley, N.M., Yang, A.C., Kim, J.T., Terrell, S.M., Li, V.L., Garcia-Contreras, M., Bertozzi, C.R., and Long, J.Z. (2021). Cell type-selective secretome profiling in vivo. *Nat Chem Biol* 17, 326-334.
- Weidemüller, P., Kholmatov, M., Petsalaki, E., and Zaugg, J.B. (2021). Transcription factors: Bridge between cell signaling and gene regulation. *Proteomics* 21, e2000034.
- Wesche, H., Korherr, C., Kracht, M., Falk, W., Resch, K., and Martin, M.U. (1997). The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem* 272, 7727-7731.
- Wik, L., Nordberg, N., Broberg, J., Björkstén, J., Assarsson, E., Henriksson, S., Grundberg, I., Pettersson, E., Westerberg, C., Liljeroth, E., *et al.* (2021). Proximity Extension Assay in Combination with Next-Generation Sequencing for High-throughput Proteome-wide Analysis. *Mol Cell Proteomics* 20, 100168.

- Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R., and Kelley, S. (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5, 835-844.
- Wissink, E.M., Vihervaara, A., Tipples, N.D., and Lis, J.T. (2019). Nascent RNA analyses: tracking transcription and its regulation. *Nat Rev Genet* 20, 705-723.
- Wu, C., Xie, T., Guo, Y., Wang, D., Qiu, M., Han, R., Qing, G., Liang, K., and Liu, H. (2023). CDK13 phosphorylates the translation machinery and promotes tumorigenic protein synthesis. *Oncogene* 42, 1321-1330.
- Wu, Y.M., Cieslik, M., Lonigro, R.J., Vats, P., Reimers, M.A., Cao, X., Ning, Y., Wang, L., Kunju, L.P., de Sarkar, N., *et al.* (2018). Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer. *Cell* 173, 1770-1782 e1714.
- Xia, L., Tan, S., Zhou, Y., Lin, J., Wang, H., Oyang, L., Tian, Y., Liu, L., Su, M., Wang, H., *et al.* (2018). Role of the NFkappaB-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* 11, 2063-2073.
- Xiao, G., Fong, A., and Sun, S.C. (2004). Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-30105.
- Yam, C.H., Fung, T.K., and Poon, R.Y.C. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 59, 1317-1326.
- 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, J., Chang, Y., Tien, J.C., Wang, Z., Zhou, Y., Zhang, P., Huang, W., Vo, J., Apel, I.J., Wang, C., *et al.* (2022). Discovery of a Highly Potent and Selective Dual PROTAC Degradator of CDK12 and CDK13. *J Med Chem* 65, 11066-11083.
- Yang, Y., Yang, Y., Yang, J., Zhao, X., and Wei, X. (2020). Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer: Function and Therapeutic Strategy. *Front Cell Dev Biol* 8, 758.
- Yesbolatova, A., Natsume, T., Hayashi, K.-i., and Kanemaki, M.T. (2019). Generation of conditional auxin-inducible degron (AID) cells and tight control of degron-fused proteins using the degradation inhibitor auxinole. *Methods* 164-165, 73-80.
- Yesbolatova, A., Saito, Y., Kitamoto, N., Makino-Itou, H., Ajima, R., Nakano, R., Nakaoka, H., Fukui, K., Gamo, K., Tominari, Y., *et al.* (2020). The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice. *Nat Commun* 11, 5701.
- Yoo, S.Y., Lee, S.Y., and Yoo, N.C. (2009). Cytokine expression and cancer detection. *Med Sci Monit* 15, 49-56.
- Yoodee, S., Noonin, C., Sueksakit, K., Kanlaya, R., Chaiyapit, S., Peerapen, P., and Thongboonkerd, V. (2021). Effects of secretome derived from macrophages exposed to calcium oxalate crystals on renal fibroblast activation. *Commun Biol* 4, 959.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The Ikb Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKKa and IKKb, Necessary for Ikb Phosphorylation and NF-kB Activation. *Cell* 91, 243-252.
- Zhai, S., Senderowicz, A., Sausville, E., and Figg, W. (2002). Flavopiridol, a Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, in Clinical Development. *The Annals of Pharmacotherapy* 36, 905-911.
- Zhang, F., Jiang, J., Xu, B., Xu, Y., and Wu, C. (2021a). Over-expression of CXCL2 is associated with poor prognosis in patients with ovarian cancer. *Medicine (Baltimore)* 100, e24125.
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H.S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M.T., Molina, H., Martin, A.B., Bojmar, L., *et al.* (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol* 20, 332-343.
- Zhang, J., Wang, J., Ng, S., Lin, Q., and Shen, H.M. (2014). Development of a novel method for quantification of autophagic protein degradation by AHA labeling. *Autophagy* 10, 901-912.

- Zhang, M., Kenny, S.J., Ge, L., Xu, K., and Schekman, R. (2015). Translocation of interleukin-1beta into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *Elife* 4.
- Zhang, M., Zhang, L., Hei, R., Cai, H., Wu, X., Zheng, Q., and Cai, C. (2021b). CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *Am J Cancer Res* 11, 1913-1935.
- Zhang, Q., Jeppesen, D.K., Higginbotham, J.N., Franklin, J.L., and Coffey, R.J. (2023). Comprehensive isolation of extracellular vesicles and nanoparticles. *Nat Protoc* 18, 1462-1487.
- Zhang, T., Kwiatkowski, N., Olson, C.M., Dixon-Clarke, S.E., Abraham, B.J., Greifenberg, A.K., Ficarro, S.B., Elkins, J.M., Liang, Y., Hannett, N.M., *et al.* (2016). Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nat Chem Biol* 12, 876-884.
- Zheng, J., Mao, Y., Feng, S., and Tian, R. (2021). Combining Metabolic Alkyne Labeling and Click Chemistry for Secretome Analysis of Serum-Containing Conditioned Medium. *Chinese Journal of Chemistry* 39, 1843-1848.
- Zhou, Q., and Yik, J.H. (2006). The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 646-659.
- Zhou, X., Dong, R., Zhang, J.Y., Zheng, X., and Sun, L.P. (2020). PROTAC: A promising technology for cancer treatment. *Eur J Med Chem* 203, 112539.
- Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., and Das, A.T. (2006). Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Ther* 13, 1382-1390.
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10, 1523.
- Zhu, Q., Han, X., Peng, J., Qin, H., and Wang, Y. (2012). The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. *Journal of Molecular Histology* 43, 699-713.

8 Anhang

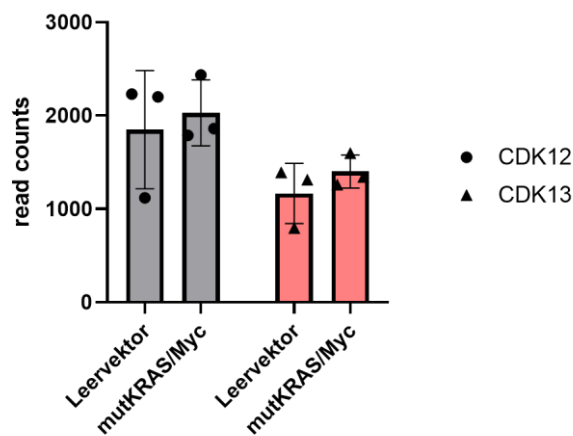


Abb. 8.1 Einfluss der Transformation auf die Expression von CDK12 und CDK13
Die RNA aus iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurde isoliert und für transkriptomweite Analysen verwendet. Die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der DeSeq2 normalisierten *read counts* von CDK12 und CDK13 der drei biologischen Replikate sind gezeigt.

	Beschreibung	$-\log_{10}(P)$
GO:0071774	response to fibroblast growth factor	4.59
hsa04668	TNF signaling pathway	4.32
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	4.29
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	4.19
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	3.63
GO:0060326	cell chemotaxis	3.59
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	3.52
hsa05417	Lipid and atherosclerosis	3.50
WP5115	Network map of SARS-CoV-2 signaling pathway	3.48
GO:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin	3.44
GO:0071216	cellular response to biotic stimulus	3.30
WP4754	IL-18 signaling pathway	3.20
GO:0009617	response to bacterium	3.07
GO:1903706	regulation of hemopoiesis	2.67
GO:0048514	blood vessel morphogenesis	2.63
GO:0007005	mitochondrion organization	2.57
R-HSA-449147	Signaling by Interleukins	2.51
GO:0006935	chemotaxis	2.42
GO:0042330	taxis	2.42
GO:0001568	blood vessel development	2.41
GO:0070848	response to growth factor	2.40
GO:0040011	locomotion	2.38
GO:0001944	vasculature development	2.36
GO:0071396	cellular response to lipid	2.36
GO:0030097	hemopoiesis	2.09
GO:0035239	tube morphogenesis	2.08

Abb. 8.2 Anreicherungsanalyse der 41 Gene, welche durch Flavopiridol herunterreguliert und durch THZ531 hochreguliert werden.
iFTSECs+Leervektor wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über die DESeq2 Analyse. Venn-Diagramme, welche die Wirkungen der beiden Inhibitoren vergleichen, wurden erzeugt. In die Analyse einbezogen wurden Transkripte, welche innerhalb folgender Filterung bei einem Vergleich mit der DMSO behandelten und IL-1 stimulierten Probe lagen: $\log_2$ FC $\geq$ 2 oder $\log_2$ FC $\leq$ -2 und $P \leq$ 0.05. Die 41 Transkripte, welche durch Flavopiridol mindestens vierfach herunterreguliert und durch THZ531 mindestens vierfach hochreguliert wurden, wurden mittels Metascape analysiert.

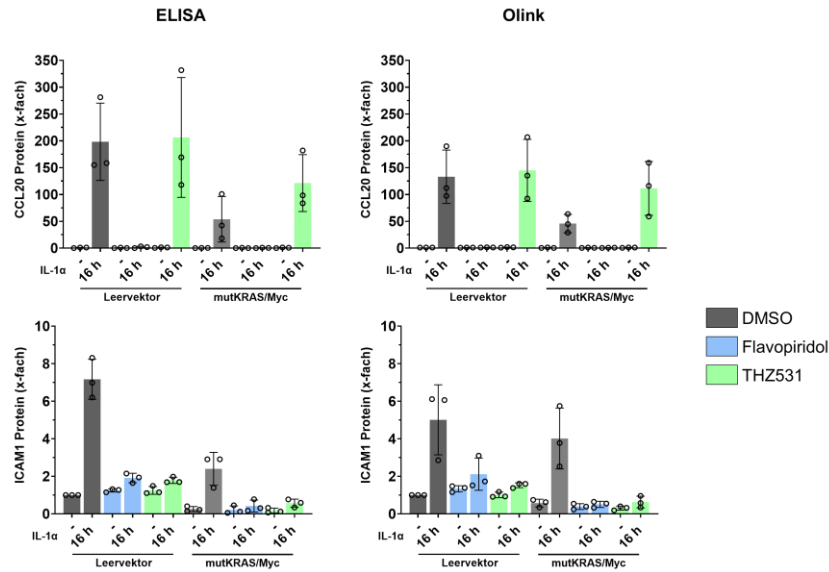


Abb. 8.3 Vergleich der ELISA und Olink Analyse

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels ELISA oder Olink (PEA) verwendet. Gezeigt sind jeweils die relativen Proteinsekretionen von CCL20 und ICAM1.

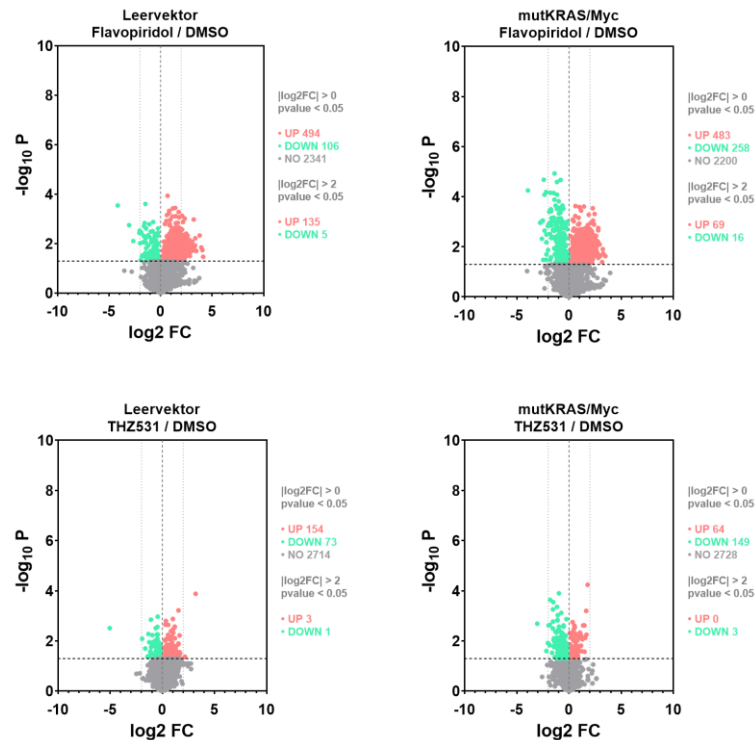


Abb. 8.4 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die basale Proteinsekretion in transformierten iFTSECs. iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. (A) Vulkanplot zum Einfluss von Flavopiridol und THZ531. Aufgetragen wurde der log₂ FC gegen -log₁₀ P. Der Vergleich wurde dabei jeweils zu der Probe der jeweiligen Zelllinie gezogen, welche mit DMSO behandelt. Herunterregulierte Proteine sind in Grün und hochregulierte Proteine in Rot dargestellt.

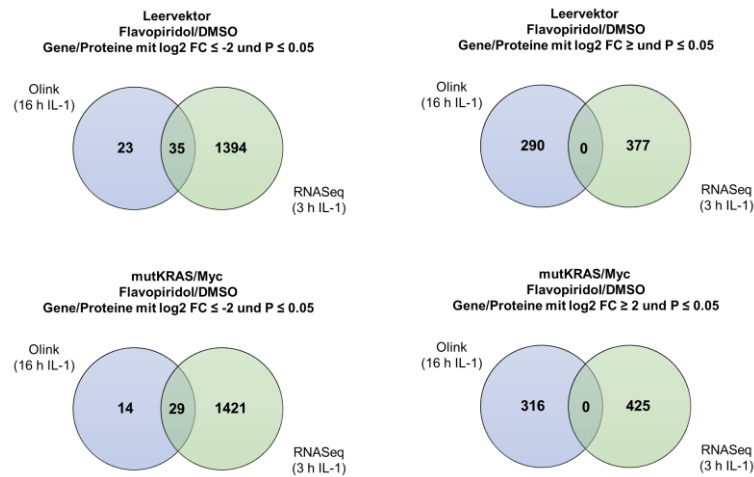


Abb. 8.5 Vergleichende Analyse des Effekts von Flavopiridol auf die Genexpression und die Proteinsekretion

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Des Weiteren wurden iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc für 1 h mit Flavopiridol [10 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. Gene bzw. Proteine, welche mindestens vierfach dereguliert waren, wurden mittels Venn-Diagrammen analysiert. In die Analyse einbezogen wurden Transkripte bzw. Proteine, welche innerhalb folgender Filterung, bei einem Vergleich mit der DMSO behandelten und IL-1 stimulierten Probe der jeweiligen Zelllinie, lagen: $\log_2 \text{FC} \geq 2$ oder $\log_2 \text{FC} \leq -2$ und $P \leq 0.05$.

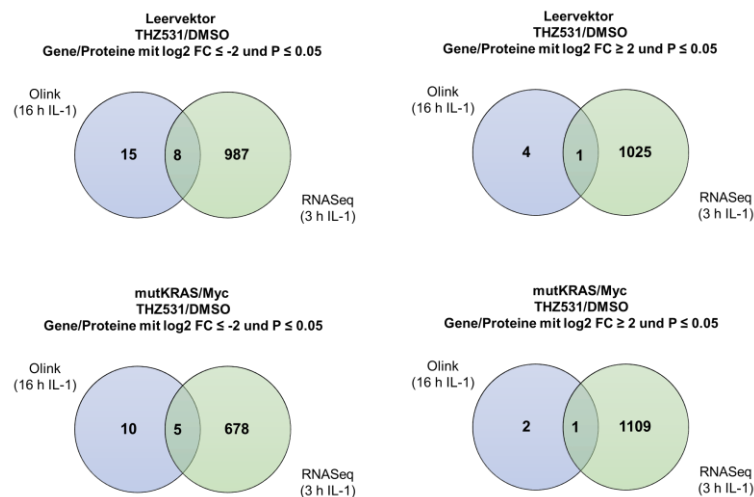


Abb. 8.6 Vergleichende Analyse des Effekts von THZ531 auf die Genexpression und die Proteinsekretion.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 3 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Des Weiteren wurden iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc für 1 h THZ531 [1 µM] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. Gene bzw. Proteine, welche mindestens vierfach dereguliert waren, wurden mittels Venn-Diagrammen analysiert. In die Analyse einbezogen wurden Transkripte bzw. Proteine, welche innerhalb folgender Filterung, bei einem Vergleich mit der DMSO behandelten und IL-1 stimulierten Probe der jeweiligen Zelllinie, lagen: $\log_2 \text{FC} \geq 2$ oder $\log_2 \text{FC} \leq -2$ und $P \leq 0.05$.

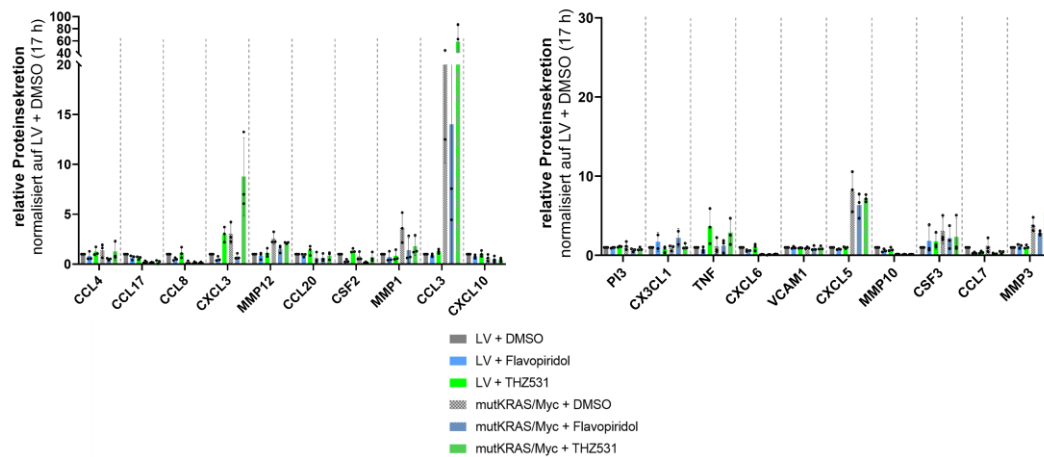


Abb. 8.7 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die basale Sekretion der TOP 20 IL-1 regulierten Proteine. iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. Die relative Proteinsekretion wurde aus den Mittelwerten der NPX-Werte berechnet. Die Normalisierung erfolgte auf die DMSO-behandelten iFTSECs+Leervektor. Die Auswirkungen der Inhibitoren auf die TOP 20 Proteine, welche in iFTSECs+Leervektor durch IL-1 induziert wurden ($\log_2$ FC > 4), sind gezeigt.

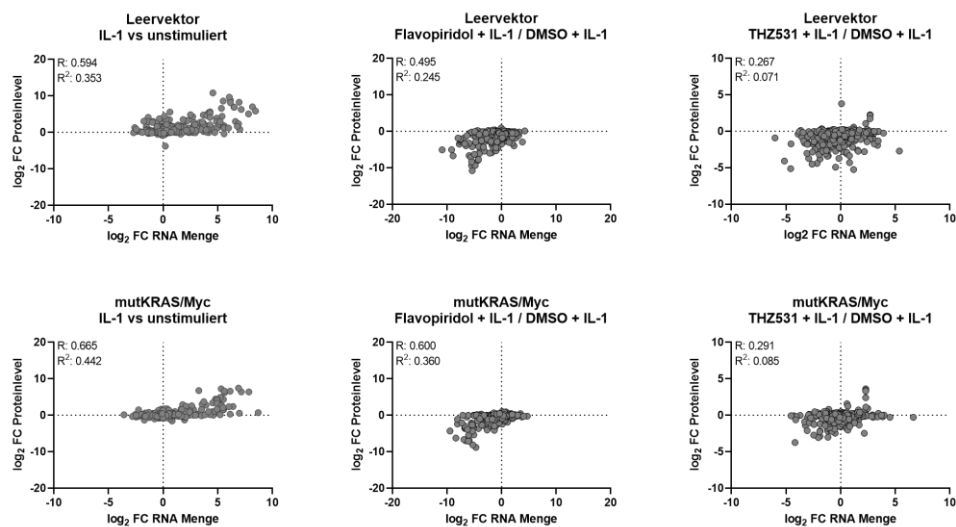


Abb. 8.8 Korrelationsanalyse der Effekte auf mRNA Ebene und Proteinebene.

iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc wurden für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und diese für eine transkriptomweite Analyse (RNASeq) aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten zu Novogene gesendet. Des Weiteren wurden iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc für 1 h mit Flavopiridol [10 μ M] oder THZ531 [1 μ M] vorbehandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 16 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Weitere Zellen blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände von drei biologischen Replikaten wurden geerntet und für Sekretomanalysen mittels Olink (PEA) verwendet. Um eine vergleichende Analyse der beiden Datensätze durchzuführen, wurde jeweils der $\log_2$ FC der RNA-Menge gegen den $\log_2$ FC der Proteinlevel aufgetragen. 521 Gene/Proteine aus Cluster IV der erfolgten Clusteranalyse mittels Morpheus wurden in die Auswertung einbezogen. Der Pearson-Koeffizient R und das Bestimmtheitsmaß R^2 wurde mittels GraphPad Prism ermittelt.

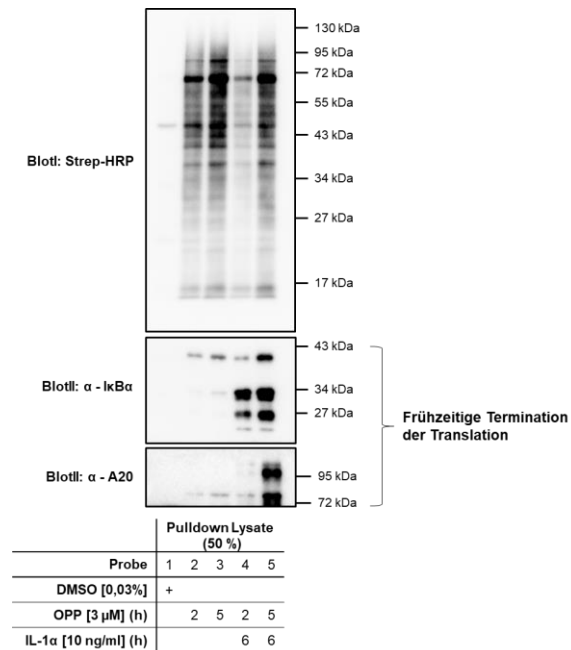


Abb. 8.9 Die metabolische Markierung mittel O-Propargyl-Puromycin (OPP) führt zu einer frühzeitigen Termination der Translation.

HCT116 Zellen wurden für 6 h mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen für 2 h oder 5 h mit OPP behandelt. Weitere Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO behandelt. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Es wurde ein *PreClearing* durchgeführt. Anschließend wurden OPP markierte Proteine mittels KLINK Reaktion biotinyliert. Nach einer Aceton-Fällung und verschiedenen Aufreinigungsschritten wurde ein Pull-down mittels Streptavidin-Beads durchgeführt, um biotinylierte Proteine aufzureinigen. Die aufgereinigten Proteine wurden im Western Blot analysiert. Die biotinylierte Fraktion wurde über Streptavidin-HRP visualisiert.

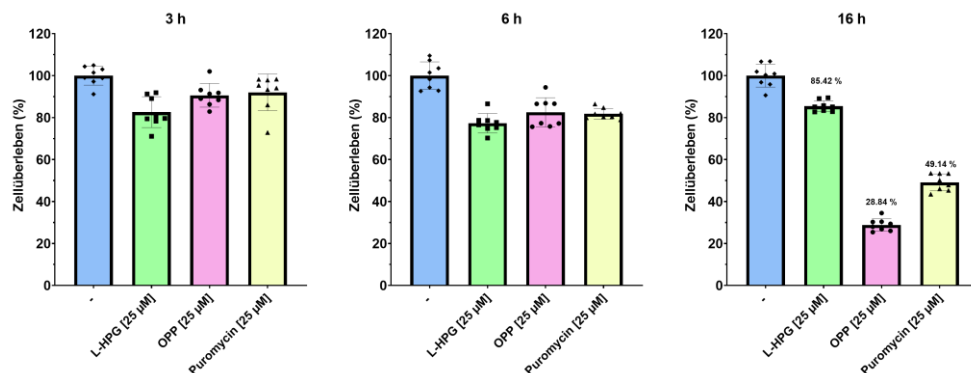


Abb. 8.10 Der Einfluss von L-Homopropargylglycin (L-HPG), O-Propargyl-Puromycin (OPP) und Puromycin auf die Zellviabilität.

HCT116 wurden für 3 h, 6 h oder 16 h mit L-HPG [25 μM], OPP [25 μM] oder Puromycin [25 μM] behandelt. Weitere Zellen, die mit L-HPG behandelt wurden, wurden dafür in Methionin-freiem Medium kultiviert. Weitere Zellen blieben unbehandelt. Anschließend wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Die Hintergrundabsorption des entsprechenden Mediums wurde von allen Werten abgezogen. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelten Zellen. Es sind die Mittelwerte (±Standardabweichung) von zwei biologischen Replikaten à vier technischen Replikaten dargestellt.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μ	Mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AHA	L-Azidohomoalanin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAK	CDK-aktivierende Kinase
Cas9	CRISPR associated protein 9
CCL	(C-C-Motiv)-Ligand
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTD	C-terminale Domäne
CXCL	(C-X-C-Motive)-Ligand
Cys	Cystein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat
Dox	Doxycyclin
DPBS	<i>(Dulbecco's) phosphate buffered saline</i>
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EV	Extrazelluläre Vesikel
FBS	<i>filtrated bovine serum</i>
FC	fold change
FVP	Flavopiridol
g	Gramm
GA	Golgi-Apparatus
h	Stunde
HA	Homologiearme
HGSOC	"high-grade" seröses Ovarialkarzinom
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hygro	Hygromycin
IAA	Indol-3-Essigsäure
IC	Inhibitorische Konzentration
ID	Identifiziertes Protein
iFTSEC	<i>immortalized fallopian tube secretory epithelial cells</i>
IKK	IκB-Kinase Komplex
IL-1	Interleukin-1

Abkürzungsverzeichnis

IPA	Intronische Polyadenylierungsstelle
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie
L-HPG	L-Homopropargylglycin
log	Logarithmus
m	milli
M	molar
mAID	mini Auxin-induziertes Degron
Met	Methionin
min	Minute
Mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	<i>mouse</i>
n	Anzahl
n	nano
Neo	Geneticin/Neomycin
NF-κB	<i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
NP-40	Nonidet P-40
OPP	O-Propargyl-Puromycin
Os	<i>Oryza sativa</i>
P	P-Wert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
Pol II	RNA-Polymerase II
PROTAC	<i>proteolysis targeting chimera</i>
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
rb	<i>rabbit</i>
Rb	Retinoblastom
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
se	<i>sense</i>
Seq	Sequenzierung
Ser (S)	Serin
sgRNA	<i>small guide RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	<i>TGF-β-activated protein kinase kinase kinase</i>
TBS-(T)	<i>Tris-buffered saline</i> (mit Tween 20)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
WT	Wildtyp
xg	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Der IL-1 vermittelte Signalweg.	8
Abb. 1.2 Die Regulation des Zellzyklus durch Cyclin-abhängige Kinasen.	14
Abb. 1.3 Regulation der Transkription durch Cyclin-abhängige Kinasen.	17
Abb. 1.4 Einfluss einer CDK12 Inaktivierung auf die Transkription.	18
Abb. 1.5 Zielmoleküle der in dieser Arbeit verwendeten CDK Inhibitoren Flavopiridol und THZ531.	21
Abb. 1.6 Funktionsweise des PROTACs BSJ-4-116.	22
Abb. 1.7 Der Weg der Genexpression.	25
Abb. 1.8 Massenspektrometrische Analyse des IL-1 induzierten Phosphoproteoms.	25
Abb. 1.9 Schematische Darstellung der Ziele (1 bis 4) dieser Arbeit zur Untersuchung des Zusammenspiels zwischen dem IL-1-NF- κ B Signalweg und verschiedenen Cyclin-abhängigen Kinasen bei der Zytokin-abhängigen mRNA Expression und Sekretion.	26
Abb. 4.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Inhibitoreffekte von Flavopiridol und THZ531.	61
Abb. 4.2 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen.	63
Abb. 4.3 Differentieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in HCT116 Zellen.	64
Abb. 4.4 Differentieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in HCT116 Zellen.	65
Abb. 4.5 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in HCT116 Zellen.	66
Abb. 4.6 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg in HeLa Zellen.	67
Abb. 4.7 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in HeLa Zellen.	68
Abb. 4.8 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in HeLa Zellen.	69
Abb. 4.9 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in HeLa Zellen.	70
Abb. 4.10 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg in OVCAR-4 Zellen.	72
Abb. 4.11 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in OVCAR-4 Zellen.	73
Abb. 4.12 Generierung eines HGSOC Modells durch sequentielle Immortalisierung und Transformation von primären Zellen des humanen Eileiters.	74
Abb. 4.13 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg von transformierten iFTSECs.	77
Abb. 4.14 Differentielle Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in transformierten iFTSECs.	79
Abb. 4.15 Die Transformation der iFTSECs beeinflusst die basale und IL-1 induzierte Genexpression.	81
Abb. 4.16 Anreicherungsanalyse mittels Metascape zur IL-1 induzierten Genexpression in transformierten iFTSECs.	83
Abb. 4.17 Differentieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die transkriptomweite, IL-1 induzierte Genexpression in transformierten iFTSECs.	85
Abb. 4.18 Vergleich der unterschiedlichen Wirkungen von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Genexpression in transformierten iFTSECs.	87
Abb. 4.19 Wirkung von Flavopiridol und THZ531 auf iFTSECs+Leervektor im Vergleich zu iFTSECs+mutKRAS/Myc.	87
Abb. 4.20 Anreicherungsanalyse mittels Metascape zum Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Genexpression in iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc.	90
Abb. 4.21 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in OVCAR-4 Zellen.	92
Abb. 4.22 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in OVCAR-4 Zellen.	93
Abb. 4.23 Differentielle Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 induzierte Proteinsekretion in transformierten iFTSECs.	95
Abb. 4.24 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf den IL-1 Signalweg nach 17 h in transformierten iFTSECs.	97

Abb. 4.25 Die Transformation der iFTSECs beeinflusst die basale und IL-1 induzierte Proteinsekretion.	99
Abb. 4.26 Flavopiridol und THZ531 beeinflussen die IL-1 induzierte Proteinsekretion in transformierten iFTSECs differentiell.	101
Abb. 4.27 Anreicherungsanalyse mittels Metascape zum Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Proteinsekretion von iFTSECs+Leervektor und iFTSECs+mutKRAS/Myc.	102
Abb. 4.28 Differentieller Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte Sekretion der TOP 20 IL-1 regulierten Proteine.	104
Abb. 4.29 Heatmap Darstellung der Z-skalierten NPX-Mittelwerte zur Untersuchung des Einflusses von Flavopiridol und THZ531 auf das Sekretom.	106
Abb. 4.30 Anreicherungsanalysen der Proteine aus den vier erzeugten Clustern mittels Metascape.	107
Abb. 4.31 Korrelationsanalyse der globalen Effekte von Flavopiridol und THZ531 auf die IL-1 vermittelte mRNA Expression und Proteinsekretion.	109
Abb. 4.32 Die Dosisabhängigkeit des PROTACs BSJ-4-116.	111
Abb. 4.33 Anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte des PROTACs BSJ-4-116.	112
Abb. 4.34 BSJ-4-116 beeinträchtigt den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen und HeLa Zellen immens.	114
Abb. 4.35 BSJ-4-116 supprimiert die IL-1 induzierte Genexpression in HCT116 Zellen und HeLa Zellen.	115
Abb. 4.36 Einfluss von 250 nM BSJ-4-116 auf die IL-1 induzierte Genexpression und Proteinsekretion.	118
Abb. 4.37 Dosisabhängige Effekte von BSJ-4-116 auf den IL-1 vermittelten Signalweg.	120
Abb. 4.38 Zeitabhängige Effekte des PROTACs BSJ-4-116 auf den IL-1 Signalweg in HCT116 Zellen.	122
Abb. 4.39 Funktionsweise des Auxin-induzierten Degron Systems.	123
Abb. 4.40 HCT116 Zellen exprimieren OsTIR1 unter Kontrolle eines <i>tet-on</i> Systems.	124
Abb. 4.41 Klonierung der sgRNAs in den Cas9-codierenden Vektor pX330.	125
Abb. 4.42 Schematische Darstellung des Insertionsbereichs für die Komponenten des Degron Systems am endogenen CDK12 Lokus.	126
Abb. 4.43 Ausschneiden der mAID-(mClover-)Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) aus den entsprechenden Addgene-Donorvektoren.	126
Abb. 4.44 Klonierung der mAID-(mClover-)Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) in den pUC5-Kan-CDK12-HAS Vektor.	127
Abb. 4.45 Überprüfung des erfolgreichen Einbaus der mAID-(mClover-)Resistenzkassetten (Hygromycin oder Geneticin/Neomycin) in den pUC57-Kan CDK12-HAS Vektor.	128
Abb. 4.46 Benötigte Vektoren für die Etablierung eines Auxin-induzierten Degron Systems.	129
Abb. 4.47 Genotypisierung der HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover Monoklone zur Überprüfung der erfolgreichen Etablierung des Degron Systems.	130
Abb. 4.48 Sequenzierung der genomischen DNA der HCT116 tet-OsTIR1 CDK12-mAID-mClover Monoklone zur Überprüfung der erfolgreichen Etablierung des Degron Systems.	131
Abb. 4.49 Charakterisierung verschiedener HCT116-tet-OsTIR1 CDK12-mAID-(mClover) Monoklone auf erfolgreiche Degradation von CDK12 nach Auxin-Behandlung.	132
Abb. 4.50 Nachweis der Auxin-induzierten Degradation von CDK12 über die Fluoreszenz von mClover.	133
Abb. 4.51 Doxycylin steigert die basale und induzierte Expression von IL-1 Zielgenen.	134
Abb. 4.52 Etablierung des siRNA-vermittelten <i>knockdowns</i> von CDK13.	136
Abb. 4.53 Moderater Einfluss der spezifischen CDK12 Degradation und der simultanen Depletion von CDK12/13 auf den IL-1 Signalweg.	139
Abb. 4.54 Moderater Einfluss der spezifischen CDK12 Degradation und der simultanen Depletion von CDK12/13 auf die IL-1 vermittelte Genexpression.	141
Abb. 4.55 Prinzip der metabolischen Markierung mittels L-HPG gefolgt von KLINK Chemie und LC-MS/MS zur Analyse naszierender Proteome.	143
Abb. 4.56 Metabolische Markierung von neu-synthetisierten Proteinen in HCT116 Zellen mittels L-Homopropargylglycin (L-HPG).	145
Abb. 4.57 Etablierung der L-HPG Markierung und KLINK Chemie für Zellkulturüberstände zur Analyse des naszierenden Sekretoms.	146

Abb. 4.58 Austestung der Einzelschritte des Protokolls zur L-HPG Markierung mit nachfolgender KLINK Reaktion für die Analyse von Zellkulturüberständen.	148
Abb. 4.59 Anpassungen des Protokolls zur Analyse des naszierenden Sekretoms in der Anwesenheit von Serum.	150
Abb. 4.60 Austestung der Analyse des naszierenden Sekretoms mittels L-HPG Markierung und KLINK Chemie über Western Blot als Vorbereitung für LC-MS/MS Analysen.	152
Abb. 4.61 Anreicherungsanalyse der 1584 identifizierten Proteine über Metascape nach Durchführung der KLINK Reaktion.	153
Abb. 4.62 Vergleich der durch L-HPG angereicherten Proteine bei verschiedenen Bedingungen. ...	154
Abb. 4.63 Analyse des naszierenden Sekretoms nach Kultivierung der Zellen mit 0 % oder mit 1 % FBS.	155
Abb. 4.64 Die L-HPG Markierung und die IL-1 Stimulation beeinflussen die Viabilität der Zellen moderat.	157
Abb. 4.65 Analyse der Gesamtproteinausbeute und der biotinylierten Proteinfraction des IL-1 induzierten Sekretoms.	159
Abb. 4.66 Anzahl der mittels LC-MS/MS identifizierten Proteine (IDs) des IL-1 induzierten Sekretoms.	160
Abb. 4.67 Anreicherung mittels LC-MS/MS identifizierter Proteine nach erfolgter L-HPG Markierung.	161
Abb. 4.68 Anreicherungsanalyse der durch L-HPG angereicherten IDs im Sekretom von HCT116 Zellen.	163
Abb. 4.69 Anreicherung mittels LC-MS/MS identifizierter Proteine nach erfolgter IL-1 Stimulation. ..	164
Abb. 4.70 Anreicherungsanalyse der durch IL-1 angereicherten IDs im Sekretom von HCT116 Zellen.	165
Abb. 5.1 Schematische Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen der verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren und genetischen Modelle.	184
Abb. 5.2 Mögliche Herkunft der Proteine, welche nach erfolgter L-HPG Markierung detektiert werden.	189
Abb. 6.1 Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse.	192
Abb. 8.1 Einfluss der Transformation auf die Expression von CDK12 und CDK13	I
Abb. 8.2 Anreicherungsanalyse der 41 Gene, welche durch Flavopiridol herunterreguliert und durch THZ531 hochreguliert werden.	I
Abb. 8.3 Vergleich der ELISA und Olink Analyse.....	II
Abb. 8.4 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die basale Proteinsekretion in transformierten iFTSECs.	II
Abb. 8.5 Vergleichende Analyse des Effekts von Flavopiridol auf die Genexpression und die Proteinsekretion.....	III
Abb. 8.6 Vergleichende Analyse des Effekts von THZ531 auf die Genexpression und die Proteinsekretion.....	III
Abb. 8.7 Einfluss von Flavopiridol und THZ531 auf die basale Sekretion der TOP 20 IL-1 regulierten Proteine.	IV
Abb. 8.8 Korrelationsanalyse der Effekte auf mRNA Ebene und Proteinebene.	IV
Abb. 8.9 Die metabolische Markierung mittel O-Propargyl-Puromycin (OPP) führt zu einer frühzeitigen Termination der Translation.....	V
Abb. 8.10 Der Einfluss von L-Homopropargylglycin (L-HPG), O-Propargyl-Puromycin (OPP) und Puromycin auf die Zellviabilität.	V

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift