

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

***Cyclin-dependent kinase (CDK) 6: ein molekularer
Schalter zwischen dem Zellzyklus und der
inflammatorischen Genregulation***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

- Biologie -

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Katja Handschick

Gießen 2014

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann

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

Tag der Disputation: 21.05.2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1. EINLEITUNG	1
1.1 Zellzyklusregulation	1
1.2 Rolle der cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) für den Zellzyklus.....	1
1.3 Regulierung der CDKs durch spezifische Inhibitoren.....	4
1.4 Cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6	5
1.4.1 Entdeckung und Struktur von CDK4/6.....	5
1.4.2 Der CDK4/6-pRb-E2F-Signalweg.....	5
1.5 Einfluss von CDK4 und CDK6 auf die Tumorentwicklung.....	7
1.6 Rolle von CDK4 und CDK6 unabhängig von der Zellzyklusfunktion.....	9
1.8 Signaltransduktion bei Entzündungsprozessen	10
1.9 Der NF- κ B Signalweg	11
1.11 <i>Crosstalk</i> zwischen dem NF- κ B- und pRb-Signalweg.....	14
1.12 Ziele der Arbeit	15
2. MATERIAL	17
2.1 Verbrauchsmaterial.....	17
2.2 Geräte.....	17
2.3 Chemikalien und Lösungsmittel.....	18
2.4 Puffer und Lösungen	18
2.5 Medien.....	21
2.6 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien.....	22
2.7 Enzyme und Inhibitoren.....	23
2.8 Standards	23
2.9 Plasmide, Primer und <i>TaqMan-Assays on Demand</i>	23
2.10 Antikörper und rekombinante Proteine	26
2.11 Bakterienstämme.....	28
2.12 Zelllinien	28
3. METHODEN	30
3.1 Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren	30
3.1.2 PCR (Polymerasekettenreaktion) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten..	30
3.1.3 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	31
3.1.4 Real Time RT-PCR	32
3.1.5 Klonierung verschiedener Vektoren	33
3.1.6 Klonierung von shRNA	34
3.1.7 Mutagenese.....	35
3.1.8 Klonierung mit der Gateway [®] -Rekombinations-Strategie	36
3.1.9 Transformation	37
3.1.10 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	37
3.1.11 Dauerkulturen von Bakterien.....	38
3.1.12 Sequenzierung	38
3.1.13 Laser-Mikrodissektion und Einzel-Zell-qRT-PCR	38
3.1.14 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	40
3.1.15 Microarray-basierende mRNA-Expressionsanalyse	41
3.1.16 Zellzyklusanalyse mittels FACS	42
3.1.17 Yeast Two-Hybrid Screen (Y2H-Screen).....	42
3.1.18 KinomeView-Analyse	43
3.1.19 Phospho-Scan-Analyse für CDK Substrate.....	44

3.2 Zellkultur	44
3.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen	44
3.2.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen	45
3.2.3 Stimulation und Ernten von Zellen.....	45
3.2.4 Transfektion.....	45
3.2.5 Herstellung eines stabil transfizierten Zellpools bzw. stabiler monoklonaler Zelllinien	46
3.2.6 Synchronisierung der Zellen.....	47
3.3 Proteinbiochemische Methoden	47
3.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen	47
3.3.2 Lysate zur Immunodetektion im Westernblot	47
3.3.3 Koimmunopräzipitation.....	48
3.3.4 Fraktionierte Lyse (Tanaka et al. 2007).....	48
3.3.5 Reportergergenversuche.....	49
3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	50
3.3.7 GST-pulldown-Assay.....	50
3.3.8 Kinase-Assay	50
3.3.9 Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen.....	52
3.3.10 Diskontinuierliche SDS-PAGE	53
3.3.11 Westernblot und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion	54
3.3.12 ELISA für IL-8.....	55
3.4 Zellbiologische Techniken	55
3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit Kernfärbung.....	55
3.4.2 Proximity Ligation Assay (PLA)	56
4. ERGEBNISSE	57
4.1 Untersuchungen zu genregulatorischen Funktionen von CDK6 in einem <i>gain-of-</i> <i>function</i> -Modell	57
4.1.1 Generierung einer Zelllinie mit regulierbarer Expression von konstitutiv aktivem CDK6	57
4.1.2 Einfluss des <i>CDK6</i> Wildtyps und der <i>CDK6</i> S178P-Mutante auf die Genregulation.....	58
4.1.3 Untersuchung der IL-1-induzierten <i>IL8</i> -Expression in HeLa Tet-On CDK6 S178P K5 Zellen auf Einzelzellebene	61
4.2 Aktivierung von CDK6 und zellzyklusabhängige Expression inflammatorischer Gene.....	63
4.2.1 Generierung einer inaktiven <i>CDK6</i> -Variante und Etablierung eines <i>in vitro</i> Kinaseassays	63
4.2.2 Aktivierung und Expression von CDK6 in Abhängigkeit von Zellzyklus und IL- 1-Stimulation	64
4.2.3 Inflammatorische Genexpression in synchronisierten Zellen.....	66
4.3 Genomweite Untersuchungen zu genregulatorischen Funktionen von CDK6 in einem <i>loss-of-function</i> Modell	69
4.3.1 Etablierung und funktionelle Charakterisierung einer monoklonalen CDK6- Knockdown-Linie	69
4.3.2 Zellzyklusspezifische Genregulation durch <i>CDK4</i> -Knockdown	71
4.3.3 Genomweite Unterschiede der IL-1 induzierten Genexpression zwischen monoklonaler shCDK4- und shCDK6-Linie	73
4.4 Untersuchung der zellzyklusspezifischen Regulation TNF α -induzierter Gene durch CDK6.....	76
4.4.1 Charakterisierung eines stabilen <i>CDK6</i> -Knockdowns in HeLa-Fucci-Zellen 77	77

4.4.2 Analyse TNF α -induzierter Genexpression in Fucci-shCDK6-Zellen mittels LMD.....	79
4.5 Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges durch CDK6	82
4.5.1 Interaktion und Koloaliation von CDK6 mit p65.....	82
4.5.2 Einfluss des CDK6-Knockdowns auf die p65-Ser536-Phosphorylierung in synchronisierten Zellen	87
4.5.3 Verstärkte Transkription durch Gal4-p65 mit aktivem CDK6 S178P	89
4.6 Charakterisierung von Signalen, die die nukleäre Lokalisation und Chromatinassoziation von CDK6 regulieren.....	90
4.6.1 Zellzyklus- und zytokinregulierte subzelluläre Lokalisation von p65 und CDK6	90
4.6.2 Einfluss von 5Z-Oxo-zeaenol und SB203580 auf die CDK6-Lokalisation	92
4.6.3 Chromatinbindung und Einfluss von CDK6 auf die p65-Rekrutierung.....	94
4.7 Kinase-abhängige und Kinase-unabhängige Funktionen von CDK6	97
4.7.1 Effekt von aktiven und inaktiven CDK6-Mutanten auf die p65-Bindung und Rekrutierung an den <i>IL8</i> -Promotor.....	97
4.7.2 Hemmung der IL-1-induzierten <i>IL8</i> -Expression in weiteren <i>CDK6</i> -Knockdown Zelllinien.....	99
4.7.3 Einfluss des Knockdowns von CDK7 und Cyclinen.....	100
4.8 Identifikation von neuen Interaktionspartnern und putativen CDK6 Substraten.....	102
4.8.1 Suche nach neuen Interaktionspartnern von CDK6 mittels Y2H-Screen.....	102
4.8.2 TRIP6 als mögliches neues CDK6 Substrat.....	104
4.8.3 Interaktion von TRIP6 mit CDK6 und p65	107
4.8.4 Koaktivierende Funktion von TRIP6	109
4.8.5 Einfluss eines TRIP6-Knockdowns auf die <i>IL8</i> mRNA-Expression und die p65-Rekrutierung	111
5. DISKUSSION	113
5.1 Verstärkte inflammatorische Genexpression im <i>gain-of-function</i> -Modell der CDK6 Kinase.....	114
5.2 Korrelation der CDK6-Aktivität und der zellzyklus-abhängigen Genexpression.....	115
5.3 Identifikation von endogenem CDK6 als Kofaktor für die Expression inflammatorischer Gene.....	115
5.4 Beteiligung weiterer CDKs und Cycline an der inflammatorischen Genexpression	116
5.5 Mechanismus der Transkriptionsregulation durch CDK6:p65-Interaktionen.....	118
5.6 Charakterisierung neuer Substrate und putativer Interaktionspartner von CDK6	121
5.7 Pathophysiologische Auswirkungen des CDK6-NF- κ B- <i>crosstalks</i>	124
6. ZUSAMMENFASSUNG	128
7. SUMMARY	130
8. LITERATURVERZEICHNIS	132
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	144
10. ANHANG.....	145
11. DANKSAGUNG.....	150
12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	151
13. PUBLIKATIONEN, PRÄSENTATIONEN, AUSZEICHNUNGEN	152

1. Einleitung

1.1 Zellzyklusregulation

In jeder sich teilenden Zelle findet ein geordneter Zellzyklus statt, durch den der regulierte Ablauf von Zellwachstum, DNA-Synthese sowie Kern- und Zellteilung gewährleistet wird, um zwei Tochterzellen zu entlassen. Ein Zellzyklus durchläuft dabei vier Phasen, die als G1-, S-, G2- und M-Phase (Mitose) bezeichnet werden, wobei die wesentlichen Ereignisse in der S-Phase mit der DNA-Synthese und in der M-Phase mit der Zellteilung stattfinden. Die dazwischenliegenden G1- und G2-Phasen werden als Lücken ("*gap*") bezeichnet. Während dieser Phasen laufen Prozesse ab, die den Abschluss der jeweils vorherigen Phase kontrollieren und den Eintritt in die folgende Phase regulieren, um Schädigungen des Organismus zu verhindern (Hartwell and Weinert 1989). So können z. B. Zellen in der G1-Phase, bevor es zur DNA-Replikation kommt, in ein Ruhestadium übergehen, welches G0 genannt wird, wenn ein Mangel an Wachstumsfaktoren bzw. antiproliferativen Signalen vorliegt (Burns and Tannock 1970). Zellen können auch in Folge der terminalen Differenzierung (z.B. Nervenzellen oder Erythrozyten) den Zellzyklus endgültig verlassen und in die Ruhephase G0 übertreten.

1.2 Rolle der cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) für den Zellzyklus

Der Übergang von einer Zellzyklusphase in eine andere wird durch verschiedene zelluläre Mechanismen strikt reguliert. Wichtige regulatorische Proteine sind hierbei die cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), die zu der Familie der Serin/Threonin Proteinkinasen gehören. Diese Enzyme sind nur unter spezifischen Vorraussetzungen während des Zellzyklus aktiv und bilden damit bestimmte Zellzyklusrestriktionspunkte ("*check points*"), die den kontrollierten Übergang in die jeweils nächste Phase gewährleisten. Basierend auf der Sequenzähnlichkeit wurden insgesamt 21 Gene im humanen Genom gefunden, die für CDKs kodieren. Fünf weitere Gene kodieren für ähnliche Proteine, die sogenannten „CDK-like“ Kinasen (CDKL), welche auch Kinasefunktionen haben, aber keine Interaktion mit Cyclinen eingehen müssen, um aktiv zu sein (Malumbres et al. 2009b). Die Familie der CDKs kann weiter in die sogenannten klassischen CDKs (CDKs 1 bis 11) und neuere Familienmitglieder unterteilt werden. Die klassischen CDKs sind seit längerem bekannt und recht gut charakterisiert. Für diese Proteine sind sowohl die entsprechenden aktivierenden Cycline als auch eine Reihe von Substraten beschrieben,

während für die neun anderen erst vor kurzem entdeckten CDKs nur wenige Informationen bekannt sind. Vier der klassischen CDKs sind spezifisch während verschiedener Zellzyklusphasen aktiv: in G1 (CDK4, CDK6, CDK2), S (CDK2), G2 und M (CDK1) (Malumbres and Barbacid 2005). Während CDK7 in allen Zellzyklusphasen aktiv ist und zur Aktivierung der CDKs beiträgt, scheinen die verbleibenden klassischen CDKs bis jetzt keine wichtige Rolle im Zellzyklusprozess zu spielen (Tab. 1). Diese sind eher an der Transkriptionskontrolle beteiligt (Rickert et al. 1996, Malumbres and Barbacid 2005).

Tabelle 1: Übersicht über die 11 klassischen CDKs

CDK	Cyclinpartner	Funktion
CDK1	Cyclin B	M Phase
CDK2	Cyclin A	S Phase, G2 Phase
CDK2	Cyclin E	G1/S Übergang
CDK3	Cyclin C	G1 Phase ?
CDK4	Cyclin D	G1 Phase
CDK5	p35	Transkription
CDK6	Cyclin D	G1 Phase
CDK7	Cyclin H	CDK-aktivierende Kinase, Transkription
CDK8	Cyclin C	Transkription
CDK9	Cyclin T	Transkription
CDK11	Cyclin L	Transkription

Die Proteinmenge von CDKs bleibt zellzyklusunabhängig im Wesentlichen konstant, während die katalytische Aktivität stark von spezifischen Bindungspartnern, den Cyclinen abhängt (Traganos 2004). Cycline enthalten eine hochkonservierte Aminosäuresequenz, welche als Cyclin-Box bekannt ist (Pines and Hunter 1989, Nugent et al. 1991). Alle Proteine, die diese Domäne aufweisen, werden den Cyclinen zugeteilt, da dieses Motiv Informationen zur Bindung und Aktivierung von CDKs enthält (Lees and Harlow 1993). Insgesamt wurden bisher 29 Proteine identifiziert, die eine Cyclin-Box aufweisen und demnach als Cycline bezeichnet werden. Von vielen dieser Proteine ist die bindende CDK oder eine andere Kinase jedoch noch nicht bekannt (Malumbres and Barbacid 2005). Die Bindung von CDK4/6 an ein D-Typ Cyclin (Cyclin D1, D2, D3) und der anschließende Transport des Komplexes zum Nukleus sind essentiell für die Aktivierung der G1-Phase (Abb. 2)(Sherr 1994). Diese Cycline werden jedoch nur solange synthetisiert, wie Wachstumsfaktoren vorhanden sind (Assoian and Zhu 1997). Neben den D-Typ Cyclinen ist Cyclin E ein weiteres G1-Cyclin, welches mit CDK2 einen Komplex eingeht, um den Übergang von der G1 in die S-Phase zu regulieren (Ohtsubo et al. 1995) (Abb. 2). Der CDK2-Cyclin E-Komplex wird zur Vermeidung der Re-Replikation der

DNA inaktiviert, sobald sich die Zelle in der S-Phase befindet, indem Cyclin E degradiert wird (Hwang and Clurman 2005). CDK2 kann dann mit dem neu synthetisierten Cyclin A assoziieren, wobei dieser Komplex den Austritt der Zelle aus der S-Phase steuert (Sherr and Roberts 1999, Malumbres and Barbacid 2001). In der späten G2- und frühen M-Phase bildet Cyclin A wiederum einen Komplex mit CDK1, um die Mitose zu fördern. Während der G2-Phase werden A-Typ Cycline degradiert und somit kann CDK1 an Cyclin B binden. Dieser Komplex intiiert die Mitose der Zelle (Malumbres and Barbacid 2001) (Abb. 2).

Um eine vollständige Kinaseaktivität eines Cyclin-CDK-Komplexes zu erlangen, ist die Phosphorylierung eines Threonins nahe der ATP-Bindestelle der CDKs notwendig (Fesquet et al. 1993, Kato et al. 1994, Matsuoka et al. 1994). Die Phosphorylierung geschieht durch die CDK-aktivierende Kinase (CAK), einem Komplex bestehend aus CDK7, Cyclin H und Mat1 (Morgan 1995, Fisher 2012). Die CDK7-Untereinheit ist verantwortlich für die CDK-Aktivierung, während die Mat1 Untereinheit die Aktivierung von CDK7/Cyclin H reguliert. Obwohl CDK7 ebenfalls eine nahe der ATP-Bindestelle liegende Phosphorylierungsstelle aufweist (Thr170), ist diese für die Kinaseaktivität innerhalb des CAK-Trimer-Komplex nicht essentiell (Fisher et al. 1995).

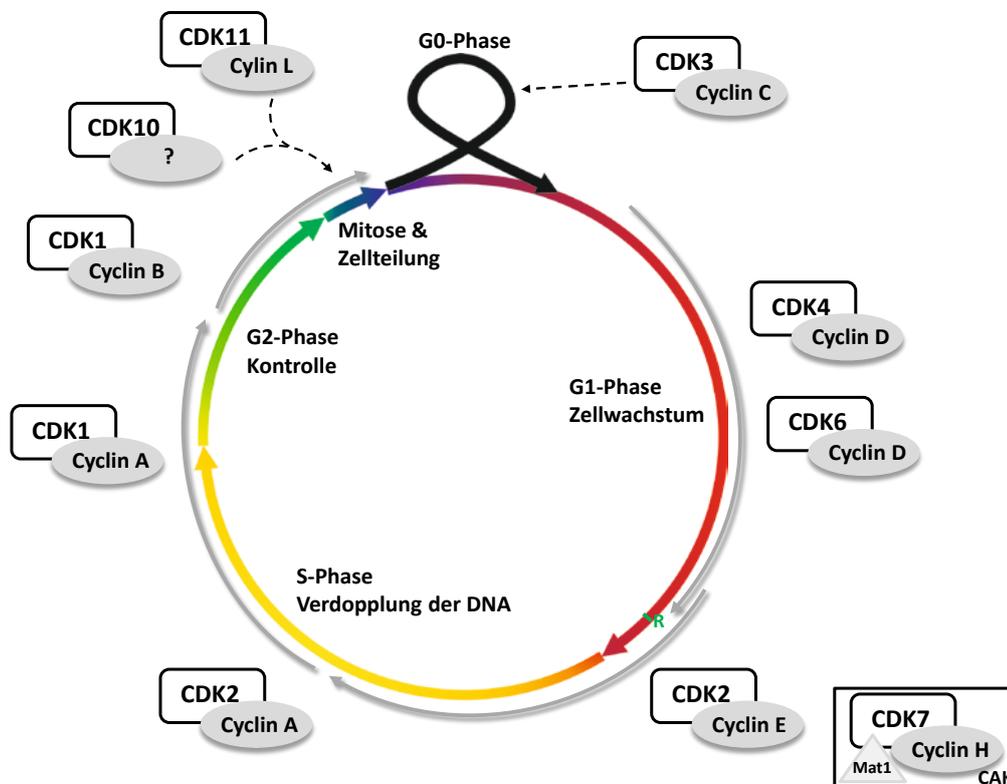


Abbildung 1: Regulation des Zellzyklus. Dargestellt ist die Regulation des Zellzyklus durch CDK-Cyclin-Komplexe (modifiziert nach Malumbres & Barbacid 2005). Die Länge der farbigen Pfeile repräsentiert in etwa die relative Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen zueinander in einer typischen sich schnell teilenden Säugetierzelle (Cooper 2000). CAK: CDK-aktivierende Kinase; Mat1: *CDK7-Cyclin H assembly factor ménage a trois 1*

Der CAK-Komplex ist während des gesamten Zellzyklus aktiv. Erst kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die CDK7-T-Loop-Phosphorylierung durch Mitogene in der G1-Phase erhöht ist und somit auch Einfluss hat auf die weitere Phosphorylierung von CDKs (Schachter et al. 2013). Außerdem ist bekannt, dass die CAK Aktivität in ruhenden G0-Zellen reduziert ist, in Tumorzellen leicht erhöht ist (Poon et al. 1994, Lolli and Johnson 2005) und CDK7 in Glioblastomen überexprimiert wird (Desai et al. 2012). Liegen CDKs im Komplex mit Cyclinen vor und werden zusätzlich durch den CAK-Komplex phosphoryliert, können diese dann vollständig aktivierten CDKs durch Phosphorylierung spezifischer Proteine wichtige zelluläre Prozesse, wie Gentranskription, Differenzierung oder Apoptose regulieren (Errico et al. 2010).

1.3 Regulierung der CDKs durch spezifische Inhibitoren

Die von Wachstumsfaktoren abhängige G1-Phase und die Initiation der DNA-Synthese während des Zellzyklus werden durch CDKs reguliert, welche wiederum durch CDK-Inhibitoren (CKIs) gehemmt werden. Aufgrund ihrer Struktur und CDK-Bindung werden CKIs in zwei Familien eingeteilt, die INK4 (*inhibitors of CDK4*) Proteine und Cip/Kip Proteine (Sherr and Roberts 1995). Zu der INK4 Familie gehören die Proteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}, welche ausschließlich die katalytische Untereinheit von CDK4 und CDK6 binden und inhibieren (Serrano et al. 1993, Guan et al. 1994, Hannon and Beach 1994, Chan et al. 1995). Inhibitoren dieser Familie bilden einen stabilen Komplex mit den Kinasen und verhindern somit die Bindung eines Cyclins (Malumbres and Barbacid 2001). Zu der Cip/Kip Familie gehören die Proteine p21^{Cip1}, p27^{Cip2} und p57^{Kip2}, welche die Aktivität aller CDKs inhibieren (Soos et al. 1996, Blain et al. 1997, LaBaer et al. 1997, Cheng et al. 1999). Die Inhibitoren haben sowohl eine Cyclin- als auch CDK-Bindestelle, so dass sie auch an bereits gebildete CDK-Cyclin-Komplexe binden können (Pavletich 1999, Malumbres and Barbacid 2005). Diese Proteine sind vorrangig Inhibitoren von CDK2/Cyclin E bzw. A Komplexen, die zur Hyperphosphorylierung von Rb führen würden. Die Rolle von Cip/Kip Inhibitoren an CDK4/6-CyclinD-Komplexen ist noch unklar. Sie können eine einerseits inhibierende Funktion haben (Sherr and Roberts 1999), jedoch konnte andererseits auch festgestellt werden, dass sie auch im Komplex mit Cyclin-CDKs assoziiert sind, ohne die Kinaseaktivität zu beeinflussen und somit als positive Regulatoren fungieren (Zhang et al. 1994, Blain et al. 1997, LaBaer et al. 1997). Die CKIs bewirken eine Konformationsänderung der CDKs, wodurch die Phosphorylierungsstelle der CAK verdeckt wird und diese nicht mehr wirken kann (Russo et al. 1998). Die Regulierung der CKIs erfolgt durch interne und externe Signale. So

unterliegt z. B. die Expression von *p21* der transkriptionellen Kontrolle des *p53* Tumorsuppressorgens (el-Deiry et al. 1993), während *p27* zum Beispiel durch Kontaktinhibition mittels TGF- β (*transforming growth factor* β) induziert wird (Yu et al. 2010).

1.4 Cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6

1.4.1 Entdeckung und Struktur von CDK4/6

Im Jahr 1987 bzw. 1992 wurden durch Klonierung und Bestimmung der Aminosäuresequenzen CDK4 (früher PSK-J3 genannt, 303 Aminosäuren, Chromosom 12) und CDK6 (früher nach dessen konservierten Aminosäuressequenzmotiv PLSTIRE benannt, 326 Aminosäuren, Chromosom 7) entdeckt und aufgrund der Homologie zu den bereits bekannten cyclinabhängigen Kinasen zugeordnet (Hanks 1987, Meyerson et al. 1992). Für CDK4 und CDK6 ergab sich eine Aminosäuresequenzidentität von 71% untereinander und von 40-50% zu den anderen Proteinen der CDK-Familie. Die Konzentration und Aktivität beider CDKs ist jedoch unterschiedlich und abhängig vom Zelltyp (Meyerson and Harlow 1994, Ciemerych and Sicinski 2005).

Die dreidimensionale Struktur von CDK4/6 ähnelt dem Muster aller Proteinkinasen dieser Familie. Sie bestehen aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, welche durch eine weitere kleinere Domäne (hinge region) miteinander verbunden sind. Die C-terminale Domäne ist vorrangig aus α -Helices aufgebaut und enthält das katalytische Zentrum mit der ATP-Bindestelle. Das katalytische Zentrum ist durch die sogenannte T-Schleife blockiert, wenn CDK4 und CDK6 sich im inaktiven Zustand befinden. Erst durch die Phosphorylierung eines Threoninrestes innerhalb der T-Schleife ist das katalytische Zentrum zugänglich. Die N-terminale Domäne ist vorrangig aus β -Faltblatt-Strukturen aufgebaut. In dieser Domäne befindet sich die für die Cyclinbindung notwendige und streng konservierte Sequenz PSTAIRE (bei CDK6) bzw. PISTVRE (bei CDK4) (Morgan 1997).

1.4.2 Der CDK4/6-pRb-E2F-Signalweg

Das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus wird durch den Retinoblastom (Rb)-Signalweg kontrolliert. Das Tumorsuppressorprotein pRb bindet reversibel an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, wodurch die Promotoraktivierung zellzyklusregulierender Gene ausbleibt. Zur Rb-Familie gehören die verwandten Genprodukte Rb, p107 und p130 (Thomas et al. 1998). In seiner nicht phosphorylierten Form inhibiert pRb Transkriptionsfaktoren der E2F Familie

(Abb.2). Dadurch wird zum einen die Hochregulation von zellzyklusrelevanten Genen verhindert und zum anderen wirkt es auf Faktoren, die für die Aktivierung der DNA-Synthese benötigt werden (Muller et al. 2001). pRb reguliert neben der Zellproliferation auch die Apoptose, Differenzierung und Entwicklung.

Der G1/S Übergang ist einer der wichtigsten Schritte im Zellzyklus und wird hauptsächlich durch CDK4/6-CyclinD-Komplexe kontrolliert (Galderisi et al. 2003). Zunächst werden CDK4 und 6, wie bereits beschrieben, durch mehrere Faktoren aktiviert (Abb. 2). Wird Rb durch den aktivierten CDK4/6-Cyclin D-Komplex phosphoryliert und damit inaktiviert, dissoziiert es aus dem Komplex mit E2F (Abb. 2). Transkriptionsfaktoren werden freigesetzt, die letztlich den Eintritt der Zelle in die S-Phase ermöglichen (z. B. E2F-1m *proliferating cell nuclear antigen* PCNA, Thymidinkinase, Cyclin E) (Nevins 2001). Es ist bekannt, dass der Rb/E2F-Signalweg in nahezu allen menschlichen Tumoren gestört ist (Weinberg 1995, Sherr 1996), wobei meistens nur eine von mehreren möglichen Mutationen im Rb/E2F-Signalweg auftritt (Nevins 2001). Offenbar ist es ausreichend, wenn nur ein Schritt in der Signalkette unterbrochen wird, um eine Deregulation der E2F-Aktivität und somit der zellulären Wachstumskontrolle zu bewirken. Dies zeigt, wie bedeutend dieser Signalweg in der menschlichen Zelle ist.

Die durch Pathogene verursachte Störung des Rb-Signalweges ist eine weitere Möglichkeit der Deregulation. Das Kaposi-Sarcom-Herpesvirus (KSHV) kodiert ein Protein, welches eine hohe Ähnlichkeit zu Cyclin D2 aufweist (Cannell and Mittnacht 1999, Laman et al. 2000). Dieses KSHV-Cyclin, auch (v)-Cyclin genannt (Abb. 2), kann sowohl mit CDK4 als auch CDK6 assoziieren (Chang et al. 1996). Der (v)-Cyclin-CDK6-Komplex zeigt eine generell erhöhte Aktivität und ein vermindertes Ansprechen auf die Inhibition durch den CDK-Inhibitor p16^{INK4a} (Jung et al. 1994, Swanton et al. 1997, Kaldis et al. 2001). Es ist bekannt, dass (v)-Cyclin in der Lage ist CDK6 unabhängig von der Phosphorylierung durch CAK zu aktivieren und dieser Komplex zeigt *in vitro* eine breitere Substratspezifität als zelluläres Cyclin D-CDK4/6 (Ojala et al. 2000, Kaldis et al. 2001, Laman and Boshoff 2001).

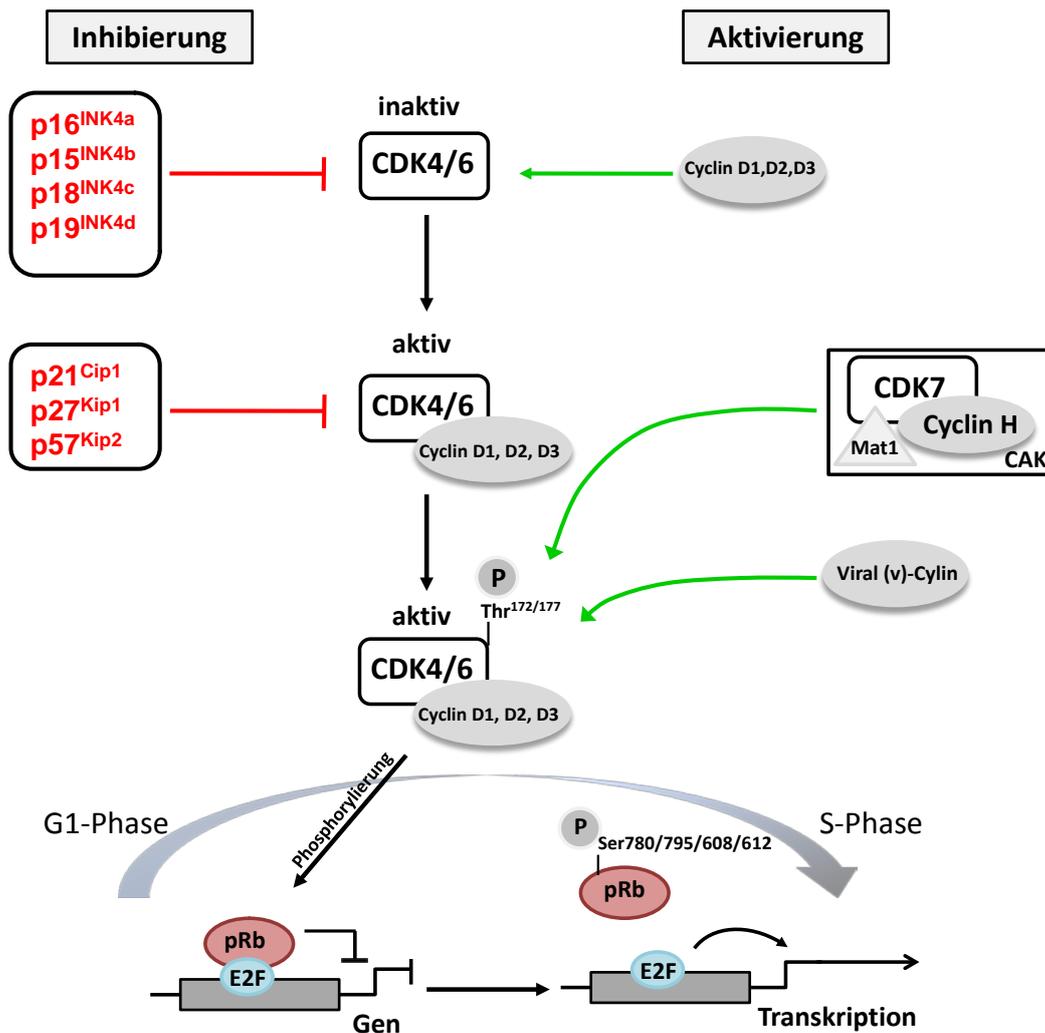


Abbildung 2: Der CDK4/6-Cyclin D-pRb-E2F-Signalweg. Dargestellt ist die Funktion von CDK4/6 im Zellzyklus. Die katalytische Aktivität wird von CDK4/6 Inhibitoren (INK4-Proteine, Cip/Kip-Proteine) und Aktivatoren (Cyclin D1-D3, CAK: CDK-aktivierende Kinase; Mat1: *CDK7-Cyclin H assembly factor ménage a trois 1*, (v)-Cyclin) reguliert.

1.5 Einfluss von CDK4 und CDK6 auf die Tumorentwicklung

Für die Zellteilung ist ein intakter und durch die korrekte Balance von Aktivatoren sowie Inhibitoren regulierter Zellzyklus Voraussetzung. Kontrollmechanismen gewähren einerseits die Reparatur auftretender DNA-Schäden und bewirken andererseits die Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose). Wird dieses Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose gestört, können maligne Tumore entstehen (Hanahan and Weinberg 2011). Die Tumorbildung entstehend aus einem deregulierten Zellzyklus geschieht u.a. durch Mutation von Proteinen, welche essentiell für den Zellzyklus sind. Gestörte Zellproliferation gehört daher zu den acht *hallmarks of cancer* (Hanahan and Weinberg 2011).

Eine deregulierte CDK4/6-Aktivität kann dabei durch folgende Mechanismen hervorgerufen werden:

Mutationen von *CDK4/6* können deren Aktivität bzw. Expression erhöhen, wie z.B. durch Veränderungen im Promotorbereich. In Patienten mit splenischem Marginalzonenlymphom wurden Translokationen kurz vor dem Transkriptionsstartpunkt von *CDK6* beschrieben (Corcoran et al. 1999). Ausserdem wurden erst kürzlich in der Literatur zwei neue Mutationen in der N-terminalen Domäne von *CDK4* entdeckt, welche in Kopf-Hals-Karzinomen vorkommen (Sabir et al. 2012).

Eine verringerte Sensitivität von *CDK4/6* gegenüber zellulären Inhibitoren führt ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität der Kinasen und letztendlich zu einer gestörten Zellproliferation (Easton et al. 1998). So ist z. B. die *CDK4*-Mutation R24C bekannt, welche zu einer verringerten Sensitivität gegenüber Inhibitoren der *INK4*-Familie führt und erstmals bei Zellen aus familiären Melanomen beschrieben wurde (Wolfel et al. 1995, Zuo et al. 1996).

In Zellen, in denen die *CDK*-interagierenden Zellzyklusinhibitoren $p16^{\text{INK4a}}$, $p15^{\text{INK4b}}$ oder $p18^{\text{INK4c}}$ fehlen oder mutiert sind, ist die onkogene Funktion von *CDK4* und *CDK6* ebenfalls erhöht (Latres et al. 2000, Sotillo et al. 2001, Bignell et al. 2010). Ein Beispiel hierfür ist die Hypermethylierung des *INK4a*-Promotors bei kolorektalen Karzinomen (Sameer et al. 2012).

Eine weitere Möglichkeit der Deregulierung von *CDK4/6* ist die erhöhte Expression *CDK4/6*-spezifischer Cycline, wie z.B. eine in Plattenepithelkarzinomzellen des Oesophagus gefundene erhöhte Expression von Cyclin D1 durch Amplifikation des entsprechenden Genlokus (Shinozaki et al. 1996).

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die künstlich generierte *CDK6*-Variante mit der Mutation S178P *in vitro* eine Cyclin D unabhängige Aktivierung bewirkt und die essentielle Phosphorylierung des benachbarten Threonins an Stelle 177 im Aktivierungsloop von *CDK6* entweder durch endogene *CDK*-aktivierende Kinase (*CAK*) oder durch zusätzliche unbekannte Kinasen fördert (Bockstaele et al. 2009). Bisher unbekannt ist, ob diese Mutation auch natürlich vorkommt.

Aus den oben genannten Gründen stellen *CDK4* und *CDK6* potentielle therapeutische Ziele gegen Krebs dar. Wenn es möglich ist die Zellzyklusregulation in proliferierenden Tumorzellen selektiv zu unterbinden, z. B. durch Hemmung der *CDK* Aktivität, führt dies zum Arrest bzw. Tod der Zellen. Es gibt verschiedene therapeutische Strategien, um die *CDK* Aktivität zu modulieren. Ein Ansatz ist es gezielt die Regulatoren der Kinaseaktivität zu verändern (indirekte Strategie), wie z. B. durch die Überexpression von *CDK* Inhibitoren oder die Hemmung der Cycline zu verhindern. Bis heute ist die direkte Inhibition der Kinaseaktivität (direkte Strategie) jedoch der erfolgreichere therapeutische Ansatz, um potentielle Zellzyklusinhibitoren zu entwickeln, da die Hemmung der enzymatischen Aktivität von *CDKs* durch orale Applikation

niedermolekularer Substanzen erfolgen kann, während die Manipulation von Cyclinen und CDK-Inhibitoren gentherapeutische Ansätze benötigen würde. Zurzeit befinden sich einige ATP-kompetitive-Inhibitoren gegen CDK4/6 in klinischen Studien, wie zum Beispiel PD332991 (Fry et al. 2004). Deren angenommene Wirkungsweise basiert auf der Theorie, dass in humanen Tumoren Zellproliferation durch aktives CDK4/6 vorangetrieben wird (Leonard et al. 2012). PD332991 ist ein hoch spezifischer Inhibitor gegen CDK4 und CDK6 und wirkt wie andere verfügbare CDK-Inhibitoren ATP-kompetitiv. Da sich die ATP-Bindestelle von CDK4 und CDK6 aufgrund ihrer hohen Verwandtschaft sehr ähnelt, ist eine spezifische Hemmung nur einer der beiden Kinasen durch solch einen Inhibitor nahezu unmöglich. Im Gegensatz zu anderen CDK4/6 Inhibitoren wie z. B. Flavopiridol (Sausville 2003, Senderowicz 2003, Baughn et al. 2006), zeigt PD332991 keine oder geringe Aktivität gegen andere Serin-, Threonin- und Tyrosinkinase. Dieser spezifische CDK4/6 Inhibitor wurde sowohl in Zellkulturmodellen als auch mit Xenograft-Maus-Modellen mit kolorektalen Karzinomen, disseminierten Myelomen oder Mantelzellymphomen umfassend untersucht und zeigte eine sehr hohe Effizienz (Fry et al. 2004, Toogood et al. 2005, Baughn et al. 2006, Saab et al. 2006). Er induziert nachweislich einen G1 arrest in kultivierten Tumorzelllinien und inhibiert in Xenograft-Modellen das Tumorwachstum, Rb-positiver humaner Tumorzellen aus zahlreichen Organen wie zum Beispiel: Brust, Gehirn und Ovarien (Finn et al. 2009, Michaud et al. 2010, Wiedemeyer et al. 2010, Konecny et al. 2011).

1.6 Rolle von CDK4 und CDK6 unabhängig von der Zellzyklusfunktion

Die Hauptaufgabe der beiden sehr homologen Kinasen CDK4 und CDK6 ist es, Mitglieder der Rb-Proteinfamilie zu phosphorylieren und dadurch Transkriptionsfaktoren freizusetzen, um die Proliferation der Zelle zu induzieren (Meyerson and Harlow 1994, Lapenna and Giordano 2009, Malumbres and Barbacid 2009a). Die Aktivierung von CDK4 kann dabei unabhängig von CDK6 geschehen (Bockstaele et al. 2009). Da *Cdk4*-Knockout-Mäuse und *Cdk6*-Knockout-Mäuse lebensfähig und fruchtbar sind, bestätigen sie die teilweise Überlappung der physiologischen Rolle dieser CDKs (Zou et al. 2002, Malumbres et al. 2004). Interessanterweise führt das Fehlen beider Kinasen in Mäusen zu embryonaler Lethalität, die durch Defekte in der Hämatopoese gekennzeichnet ist (Malumbres et al. 2004, Kozar and Sicinski 2005). Zellen aus diesen Embryos zeigen jedoch normale Zellproliferation (Kozar and Sicinski 2005). Dieses trifft sogar für Dreifach-Knockouts von CDKs in CDK3-defizienten

Mäusen zu. In der Abwesenheit von CDK4, 6 und CDK2 kann offenbar CDK1 an D-Cycline binden und den Zellzyklus *in vitro* propagieren (Santamaria et al. 2007). Offenbar ist also unter diesen Bedingungen nur CDK1 für den Zellzyklus essentiell, während die anderen CDKs gewebespezifische Funktionen kontrollieren.

CDK4 und CDK6 haben darüberhinaus weitere wichtige Funktionen, die nicht mit dem Zellzyklus verbunden sind. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit in *Cancer Cell* beschreibt außerdem eine Funktion von CDK6, die unabhängig von dessen Kinasaktivität ist. CDK6 soll dabei als transkriptioneller Regulator am $p16^{INK4a}$ - und *VEGF*-Promotor im Komplex mit c-Jun und STAT3 wirken (Kollmann et al. 2013). Chromatin-assoziierte transkriptionelle regulatorische Funktionen wurden für stress-aktivierte Proteinkinasen und Proteinkinase C bereits beschrieben (de Nadal and Posas 2010, Sutcliffe et al. 2011, Duch et al. 2013). Für CDK6 wurde als zusätzliche Funktion neben der Zellzyklusfunktion auch eine Rolle für die Differenzierung von Zelltypen wie Astrozyten und T-Zellen gezeigt (Ericson et al. 2003, Grossel and Hinds 2006, Hu et al. 2009). Ein weiterer Hinweis für vermutlich wichtige Funktionen beider Kinasen außerhalb der Zellzykluskontrolle ist die Identifikation einer großen Anzahl potentieller neuer CDK4 und CDK6 Substrate, welche mittels eines Überexpressions-systems erfolgte (Anders et al. 2011).

1.8 Signaltransduktion bei Entzündungsprozessen

Die Entzündung ist eine komplexe Abwehrreaktion des Organismus. Die Erkennung von Pathogenen durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) oder durch Zellschaden-assoziierte molekulare Muster (*damage associated molecular patterns*, DAMPs) bewirkt die Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrose-Faktor (TNF α) durch Zellen des angeborenen Immunsystems (Dinarello 2009, Gaestel et al. 2009). Durch diese inflammatorische Immunantwort werden verschiedene Signalwege aktiviert, die die Expression sowohl von pro- als auch anti-inflammatorischen Mediatoren regulieren.

TNF α wird nach Kontakt mit einem Pathogen oder Zytokin bevorzugt in Makrophagen, Lymphozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und neutrophilen Granulozyten gebildet (Aggarwal and Natarajan 1996). Es bindet an spezifische TNF-Rezeptoren und bewirkt die Produktion von weiteren Zytokinen, welche den Entzündungsprozess aufrechterhalten (Locksley et al. 2001).

IL-1 α und IL-1 β werden von verschiedenen Zelltypen produziert wie z. B. Monozyten, Makrophagen und Gewebezellen (Matsuki et al. 1991). IL-1 α und

IL-1 β binden den Rezeptor IL-1R1, wodurch ein Ko-Rezeptor, das IL-1R akzessorische Protein (IL-1RAcP) rekrutiert wird. IL-1RAcP kann nicht direkt an IL-1 binden, ist aber essentiell für die IL-1 vermittelte Signalantwort. Durch die Homodimerisierung der cytosolischen Anteile des Rezeptordimers werden weitere Signalmoleküle rekrutiert (Dinarello 1996).

Diese bei der Entzündung aktivierte Signaltransduktion umfassen die Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Signalkaskaden (*mitogen activated protein kinases*, MAPK) und den NF- κ B-Signalweg, welche über komplexe transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen die Expression und Freisetzung vieler weiterer Entzündungsmediatoren regulieren (Gaestel et al. 2009, Weber et al. 2010).

1.9 Der NF- κ B Signalweg

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells*) wurde erstmals 1988 aus B-Zellen aufgereinigt und analysiert (Kawakami et al. 1988). NF- κ B reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die für zelluläre Prozesse wie Entzündungen, Immunreaktionen, Proliferation und Tumorentstehung wichtig sind (Hayden and Gosh 2008, Baud and Karin 2009). NF- κ B ist ein DNA-Bindekomplex der aus Homo- und Heterodimeren von Vertretern der Rel-Familie besteht. In Säugetieren existieren fünf Mitglieder dieser Proteinfamilie: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (Vorläuferform p105) und p52 (Vorläuferform p100) (Rothwarf and Karin 1999). Die Bezeichnung Rel bezieht sich auf *v-Rel*, ein Onkogen des Retikuloendotheliose-Virus, welches in verschiedenen Vogelarten Leukämien induziert (Stephens et al. 1983).

Die stärkste transkriptionelle Aktivität des NF- κ B-Komplexes wird durch die p65 Untereinheit vermittelt, welche häufig als Heterodimer mit p50 vorliegt (Schmitz et al. 2004). Um als spezifischer Transkriptionsaktivator zu fungieren, muss eine Transaktivierungsdomäne vorliegen. Nur c-Rel (zelluläre Homolog zu *v-Rel*), RelB und p65 besitzen diese Domäne jeweils im C-terminalen Bereich (Hannink and Termin 1989, Schmitz et al. 1994). Aus diesem Grund wirken Homodimere von p50 bzw. p52 als transkriptionelle Repressoren von NF- κ B-Zielgenen (Schmitz and Baeuerle 1991).

Zur Bestimmung von Protein-DNA-Interaktionen wurden mittels ChIP-on-Chip (*Chromatin Immunoprecipitation DNA-Sequencing Chip*), in der eine Chromatin-Immunpräzipitation und die Hybridisierung mit einem DNA-Microarray kombiniert wird, Tausende von NF- κ B DNA Bindestellen im Genom identifiziert (Martone et al. 2003, Natoli et al. 2005, Schreiber et al. 2006, Lim et al. 2007). Die Aktivität von NF- κ B am Chromatin wird durch spezifische posttranslationale

Modifikationen wie Ubiquitinierung (Li et al. 2012), Acetylierung (Chen et al. 2005), Phosphorylierung (Schmitz et al. 2004, Wietek and O'Neill 2007) und durch die Rekrutierung von spezifischen nukleären Cofaktoren feinreguliert. Für die Immunantwort relevante und von NF- κ B regulierte Gene sind z. B. Zytokine (u.a. *IL1*, *IL2*, *IL6*, *IL12*), Chemokine (u.a. *IL8*, *MCP1*, *RANTES*) und induzierbare Enzyme wie COX-2 (Ghosh et al. 1998, Zhang and Ghosh 2001). Diese bewirken eine Entzündungsreaktion durch Stimulation der adaptiven Immunantwort, Bekämpfung der Infektion, vermehrte Rekrutierung von Leukozyten in infizierte Gewebe und Gewebeerneuerung. Das humane Interleukin (IL)-8 ist einer der bedeutsamsten Vertreter der Chemokine. Es rekrutiert in vielen Zelltypen zu Beginn der Abwehrreaktion vorwiegend Granulozyten an den Entzündungsort, aktiviert diese und reguliert darüber hinaus auch die Neoangiogenese und kann so auch pro-tumorigen wirken (Baggiolini 2001, Sparmann and Bar-Sagi 2004, Waugh and Wilson 2008).

Durch eine Vielzahl äußerer Reize, wie z.B. Zytokine, DNA-Schäden, Stress oder Strahlungen können verschiedene NF- κ B Signalkaskaden aktiviert werden (Pahl 1999). Viele Zytokine steuern wichtige physiologische Prozesse, die im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen, Immunregulation und Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen stehen. IL-1 und TNF α als proinflammatorische Stimuli (Kracht and Saklatvala 2002) aktivieren die MAPK JNK und p38 sowie den Transkriptionsaktivator NF- κ B (Abb. 3). Die MAPK Kinase Kinase (MKKK) TAK1 (*TGF- β -activated protein kinase*) stellt dabei eine zentrale Protein für mehrere Signalwege dar, dessen Aktivität durch die Adapterproteine TAB1-3 (*TAK-binding protein*) kontrolliert wird (Cheung et al. 2004). So führt die Ubiquitinbindung von TAB und TAK1 zur Autophosphorylierung von TAK1 an Threonin 187 und damit zu dessen Aktivierung (Wang et al. 2001, Chen 2012). MKKK sind Serin-/Threonin-Kinasen, die nach Aktivierung MAPK Kinasen (MKK) in einem konservierten Motiv phosphorylieren. Diese wiederum bewirken eine Aktivierung von MAPK durch eine doppelte Phosphorylierung an ihrem Tripeptid-Motiv (Thr-X-Tyr) (Payne et al. 1991). Nach einem Stimulus kann somit TAK1 mittels Phosphorylierung von MKK4 die Aktivierung von JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und durch Phosphorylierung von MKK3 und MKK6 die Aktivierung von p38 MAPK vermitteln (Abb. 3) (Moriguchi et al. 1996, Shirakabe et al. 1997, Wang et al. 1997). Phosphorylierte MAPK bewirken im Zellkern schließlich eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vor allem der AP-1 Familie und beeinflussen Transkription, Chromatinremodelling und Translation (Kyriakis and Avruch 2001).

Aktiviertes TAK1 kann neben den MAPK-Signalwegen auch den NF- κ B-Signalweg durch Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK-Komplex)

stimulieren (Sakurai et al. 1999) (Abb. 3). Ohne eine äußere Stimulation der Zelle liegen NF- κ B-Dimere mit p65 inaktiv im Cytoplasma in einem Komplex mit dem Inhibitorprotein I κ B (*inhibitor of NF- κ B*) vor (Li et al. 2002). Insgesamt gibt es acht I κ B-Proteine: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , BCL-2, I κ B ζ , I κ BNS, p100 und p105 (Ghosh and Hayden 2008). Die Komplexbildung erfolgt durch die Interaktion der "ankyrin repeat"-Domäne der I κ Bs mit der Rel-Homologie-Domäne (RHD) der NF- κ B-Proteine, wodurch die Kernlokalisationssequenz und die DNA-Bindungsdomäne der NF- κ B Proteine maskiert und somit die Translokation von NF- κ B in den Zellkern und die DNA-Bindung verhindert werden (Hatada et al. 1993). Die p65-Untereinheit von NF- κ B-Dimeren wird nur durch I κ B α inhibiert (Schmitz et al. 2004, Solt and May 2008).

Der IKK-Komplex besteht aus den katalytischen Kinaseuntereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorisch wirkenden Untereinheit IKK γ (NEMO) (Scheidereit 2006). p65 enthaltende NF- κ B-Heterodimere werden durch die proteolytische Degradation von I κ B α durch IKKs in der kanonischen NF- κ B-Signalkaskade aktiviert (Li et al. 2002). Dabei wird I κ B α an den Serinen 32 und 36 von IKK β phosphoryliert (Brown et al. 1995), wodurch die E3-Ubiquitin-Ligase SCF ^{β -TRCP} (*Skp1/Cul1/F-Box-protein, β -transducin repeat containing protein*) die I κ B α Lysinreste für den proteasomalen Abbau markiert (Heissmeyer et al. 2001). Die NF- κ B Untereinheit löst sich von I κ B α , gelangt in den Kern und bindet an Promotoren der Zielgene, deren Gentranskription dadurch aktiviert wird. Die nukleäre Aktivität von chromatin-assoziierten NF- κ B-Komplexen wird durch verschiedene Mechanismen wie Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Acetylierung komplex reguliert, um eine vollständige Induktion der NF- κ B-regulierten Zielgene zu ermöglichen (Schmitz et al. 2004) (Abb. 3). So bewirkt z.B. eine Phosphorylierung an Serin 529 und 536 von p65 eine vermehrte Translokation in den Nukleus und eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität, während eine Phosphorylierung von p65 an Serin 486 sich negativ auf die Aktivierung auswirkt (Buss et al. 2004, Chen and Greene 2004, Huang et al. 2010, Perkins 2012).

Die Genexpression von I κ B α wird ebenfalls von NF- κ B reguliert, was zu einer negativen Rückkopplungsschleife führt, die zur Termination der NF- κ B-Aktivität führt (van Loo and Beyaert 2011).

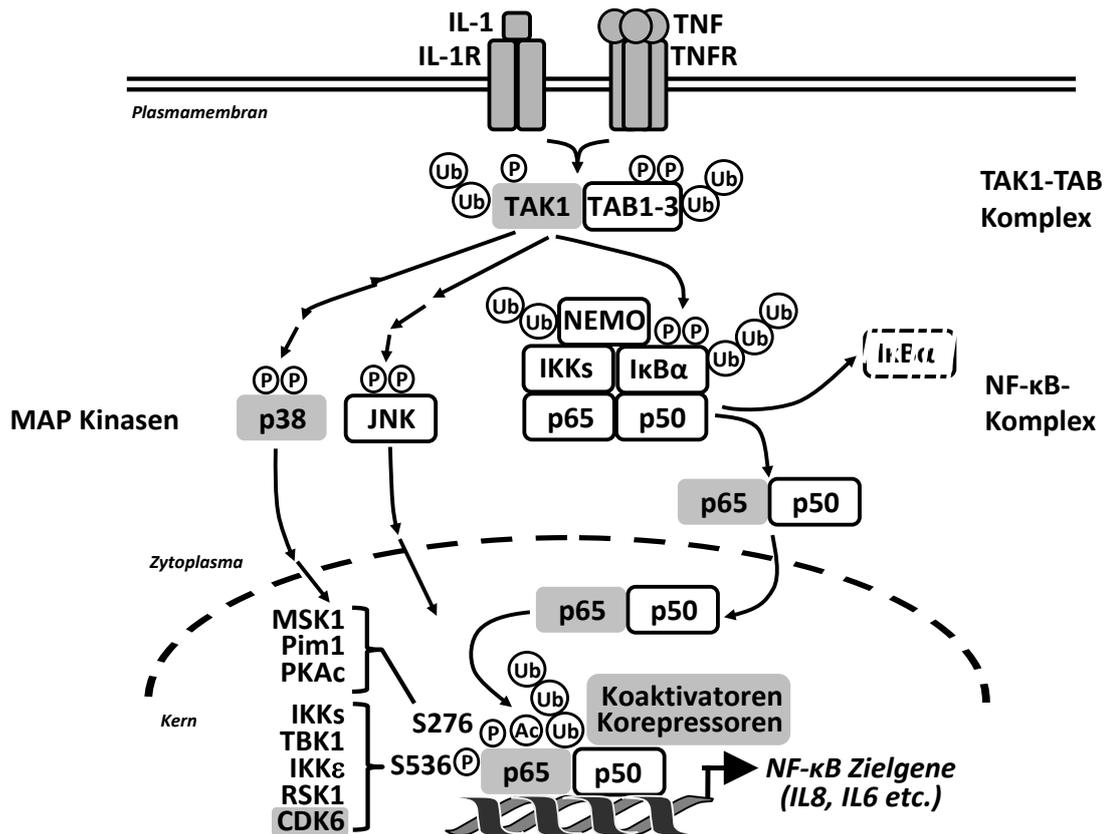


Abbildung 3: Schematische Darstellung wichtiger Komponenten und Regulationsschritte des zytokinregulierten NF- κ B-Signalweges. Proinflammatorische Stimuli wie IL-1 und TNF aktivieren den TAK1-TAB-Komplex. Dieser wiederum bewirkt die Aktivierung von MAP-Kinasen wie p38 und JNK, welche im Zellkern indirekt die Aktivierung von p65-Zielgenen fördern. Der TAK1-TAB-Komplex bewirkt ebenso die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges über den IKK-Komplex, wodurch p65 frei im Zytoplasma vorliegt, in den Zellkern gelangt und an die DNA binden kann. Multiple Phosphorylierungen (P) und degradative sowie nicht-degradative Ubiquitinylierungen (Ub) regulieren die Aktivität oder den Abbau an fast allen wichtigen Schaltstellen der IL-1- oder TNF-Signaltransduktion. In grau dargestellt sind Moleküle und Signalkomplexe, die in dieser Dissertation experimentell untersucht wurden.

1.11 Crosstalk zwischen dem NF- κ B- und pRb-Signalweg

Neben der Regulation von angeborenen und erworbenen Immunantworten spielt NF- κ B auch eine wichtige Rolle bei zellulären Vorgängen wie Zellproliferation und Apoptose. Durch die konstitutive Aktivität von *upstream*-Regulatoren kommt es offenbar in vielen Krebszelllinien zu einer gesteigerten, nukleären Aktivierung von NF- κ B (Kim et al. 2006, Perkins 2012, Hoesel and Schmid 2013). Hierdurch wird die Expression von Proteinen, die antiapoptotische und proliferierende Effekte hervorrufen, gefördert (Kucharczak et al. 2003). Zusätzlich kann NF- κ B direkt die Promotoren von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D und E aktivieren und somit direkt in die Kontrolle der Zellproliferation eingreifen (Guttridge et al. 1999, Hinz et al. 1999, Joyce et al. 2001).

Zusammengefasst gibt es eine Reihe von Hinweisen auf eine Verbindung zwischen dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher die Expression inflammatorischer und tumorfördernder Gene reguliert (DiDonato et al. 2012) und wichtigen Zellzyklusregulatoren im pRb-Signalweg. Inwieweit dagegen Zellzyklus-modulierende Faktoren wie D-Cycline oder CDK4/6 einen Einfluss auf NF- κ B regulierte Prozesse haben, ist allerdings weit weniger gut verstanden. Die erst kürzlich neu entdeckten zellzyklusunabhängigen CDK4/6 Substrate (Anders et al. 2011) sowie die entdeckten kinaseunabhängigen Funktionen von CDK6 als transkriptioneller Regulator (Kollmann et al. 2013) geben zusätzliche mögliche Hinweise auf den *crossstalk* zwischen NF- κ B und pRb.

1.12 Ziele der Arbeit

Durch die eingehende Untersuchung der molekularen Regulation entzündlicher Gene, wurde in der Arbeitsgruppe ein entscheidendes Indiz für einen möglichen *crossstalk* zwischen dem pRb-Signalweg und dem NF- κ B Signalweg gefunden. In Vorarbeiten wurde eine neue Kinase charakterisiert, welche *in vitro* p65 direkt an Ser536 phosphoryliert. Diese Kinase wurde durch massenspektrometrische Analyse als CDK6 identifiziert. Über eine Verbindung zwischen der durch den NF- κ B Signalweg regulierten inflammatorischen Genexpression und der CDK6-abhängigen Zellproliferation war zu Beginn der Promotionsarbeit kaum etwas bekannt. Aus diesem Grund sollte in der folgenden Arbeit der Zusammenhang von Zellzyklus und inflammatorischer Genexpression und den dabei beteiligten Faktoren mechanistisch und funktionell näher untersucht werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein *gain-of-function*-Modell zu etablieren, welches eine regulierte Überexpression von CDK6 ermöglicht. Dabei sollte der Einfluss dieser Überexpression auf die zytokin-regulierte inflammatorische Genexpression näher charakterisiert werden.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob zellzyklusabhängige Signale inflammatorische Gene regulieren und in wieweit CDK4 und CDK6 eine Rolle bei dieser Regulation spielen.

Die Phosphorylierung von p65 durch CDK6 ließ auf eine mögliche Verbindung zwischen dem Zellzyklus und der Regulation entzündlicher Prozesse schließen. Deshalb sollten mögliche Interaktion, Kolokalisation und Chromatinassoziation beider Proteine näher charakterisiert werden.

Um die putative Bedeutung von CDK6 außerhalb des Zellzyklus besser verstehen zu können, war außerdem die Identifikation neuer Interaktionspartner und Substrate dieser Kinase sowie deren anschließende Charakterisierung vorgesehen.

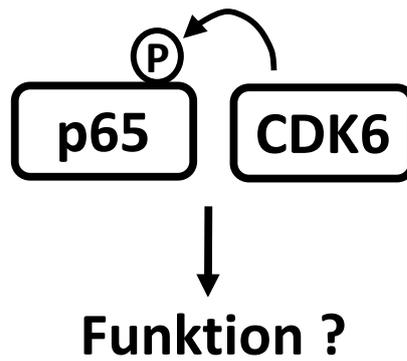


Abbildung 4: Ausgangssituation zu Beginn der Arbeit. Dargestellt sind CDK6 als zellzyklusrelevante Kinase und p65 als wichtigster Transkriptionsfaktor für inflammatorische Gene. CDK6 wurde durch Vorarbeiten als direkte Kinase von p65 an Ser536 identifiziert. Das Hauptziel dieser Arbeit war daher die Überprüfung der Hypothese, dass im Zellzyklus aktiviertes CDK6 zelluläre p65-Funktionen modulieren kann sowie die Entschlüsselung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Plastikwaren und Einwegmaterialien wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, IBIDI, Neolab, Nunc, Omnilab, Roth oder Sarstedt bezogen.

2.2 Geräte

Elektrophorese- und Westernblotsysteme

- Elektrophorese Power Supply EPS 600, 601 und 3500, Pharmacia Biotech
- *Semi-Dry*-Blotter, Peqlab Biotechnologie
- Elektrophoresekammer, Thermo Scientific

Mikroskope und Photometer

- Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies
- LMD 6000, Leica
- DMIRE2, Leica
- FW 4000, Leica
- Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab
- Spectramax Plus, Molecular Devices Microplate Spectrophotometer
- Luminometer Fluoroscan Ascent FL, Labsystems

Zellkultur

- Wasserbad, GFL
- Brutschrank CO₂ Autozero, Heraeus
- Sterilwerkbank Hera Safe Typ HS15, Heraeus

Zentrifugen

- Optima™ TLX Ultrazentrifuge, Beckman Coulter
- TJ-25 Centrifuge, Beckman Coulter
- Sorvall RC5S Plus, Thermo Scientific
- Tischzentrifuge 5424, Eppendorf
- Kühlzentrifuge 5415 R, Eppendorf

Allgemein

- Bioruptor™ NextGen, Diagenode
- Sonifier 250, Branson

- Gel iX Imager UV-Transilluminator, INTAS
- Thermomixer compact, Eppendorf
- Thermocycler T Professional, Biometra
- Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Schüttler Unimax 2010, Heidolph
- Pipetboy, Integra
- Filmentwicklermaschine Curix 60, AGFA
- 7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystem
- Eismaschine, Ziegra
- AT 250 Waage, Mettler

2.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma bezogen (Qualitätsstufe "p.a.", "Für die Molekularbiologie" oder "cell culture grade").

2.4 Puffer und Lösungen

ATP-Puffer

150 mM Tris
30 mM MgCl₂
pH 7,4 mit HCl einstellen

Auskochpuffer für Dialyseschlauch

10 mM EDTA
100 mM NaHCO₃

Bohmann/Weiss (Weiss et al. 2003)

-Lysepuffer

50 mM HEPES pH 7,4
50 mM NaCl
1% (v/v) Tween 20
2,5 mM EGTA
1 mM EDTA
1 mM NaF
10 mM β-Glycerophosphat
0,1 mM Na₃VO₄
1 mM PMSF

ChIP-Lysepuffer

1% (w/v) SDS
10 mM EDTA
50 mM Tris/HCl pH 8.1
1x Proteaseinhibitormix
1 mM PMSF

ChIP-Dilutionspuffer

0,01% (w/v) SDS
1,1% (v/v) Triton X-100
1,2 mM EDTA
167 mM NaCl
16,7 mM Tris/HCl pH 8,1

ChIP-Niedrigsalzpuffer

0,1% SDS
1% (v/v) Triton-X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris/HCl pH 8,1
150 mM NaCl

1x Proteaseinhibitormix
1 mM DTT

Bohmann/Weiss(Weiss et al. 2003)

-Waschpuffer

50 mM HEPES pH 7,4
450 mM NaCl
1% (v/v) Tween 20
2,5 mM EGTA
1 mM EDTA
1 mM NaF
10 mM β -Glycerophosphat
0,1 mM Na_3VO_4
1 mM PMSF
1x Proteaseinhibitormix
1 mM DTT

ChIP-LiCl-Puffer

250 mM LiCl
1% (w/v) NP40
1% (w/v) Deoxycholat
1 mM EDTA
10 mM Tris/HCl pH 8,1

Coomassie Brilliant Blue-Lösung

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250
20% (v/v) Methanol
33% (v/v) Essigsäure

Dialysepuffer

20 mM Tris
100 mM NaCl
2 mM DTT
pH 7,4 einstellen mit HCl

Elutionspuffer

10 mM Glutathion
50 mM Tris
pH 7,4 einstellen mit HCl

ChIP-Hochsalzpuffer

0,1% SDS
1% (v/v) Triton-X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris/HCl pH 8,1
500 mM NaCl

IP-Puffer (Kinaseversuche)

20 mM Tris pH 7,4
154 mM NaCl
1%(v/v) TritonX-100
1 mM Na_3VO_4
2 mM DTT
50 mM NaF

10xLaemmli-Laufpuffer

250 mM Tris
1,92 M Glycin
1% (w/v) SDS

Luziferase-Reagenz (135ml)

200 mM Tricin
1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
2,67 mM MgSO_4
33,3 mM DTT
30 mg Coenzym A
472 μM D-Luziferin
0,53 mM ATP

Entfärbelösung

30% (v/v)	Methanol
1% (v/v)	Ameisensäure

2xHEBS (sterilfiltriert)

280 mM	NaCl
50 mM	HEPES
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
pH 7,12 mit NaOH einstellen	

Ponceau-Rot-Lösung

0,1% (w/v)	Ponceau S
5% (v/v)	Essigsäure

Puffer I für fraktionierte Lyse

20 mM	HEPES (pH 8,0)
10 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
0,1% (v/v)	TritonX-100
20% (w/v)	Glycerol
50 mM	NaF
1 µM	Microcystin
1 mM	Na ₃ VO ₄
1x Proteaseinhibitormix	

Puffer II für fraktionierte Lyse

20 mM	HEPES (pH 8,0)
2 mM	EDTA
400 mM	NaCl
0,1% (v/v)	TritonX-100
20% (w/v)	Glycerol
50 mM	NaF
1 µM	Microcystin
1 mM	Na ₃ VO ₄
1x Proteaseinhibitormix	

Puffer III für fraktionierte Lyse

20 mM	Tris (pH 7,5)
2 mM	EDTA

PBS

137 mM	NaCl (pH 7,4)
2,7 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,8 mM	KH ₂ PO ₄
pH7,4 einstellen mit HCl	

Trenngelpuffer

1 M	Tris
pH 8,8 einstellen mit HCl	

Sammelgelpuffer

1 M	Tris
pH 6,8 einstellen mit HCl	

1x Semi Dry Blotpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol

1xSpeziallysepuffer

30 mM	Natriumpyrophosphat
50 mM	NaCl
1% (v/v)	Triton X-100
2 mM	Na ₃ VO ₄
50 mM	NaF
20mM β-Glycerophosphat	
10 mM	Tris
pH 7,05 einstellen mit HCl	
1 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
1 mM	PMSF
1 µM	Microcystin

150 mM	NaCl	<u>β-Gal-Lysepuffer</u>	
1% (w/v)	SDS	8,5 mM	KH ₂ PO ₄
1% (v/v)	NP-40	106 mM	K ₂ HPO ₄
50 mM	NaF	pH 7,8 einstellen mit HCl	
1 μM	Microcystin	1 μg/ml	Pepstatin
1 mM	Na ₃ VO ₄	10 μg/ml	Leupeptin
1x Proteaseinhibitormix		1 mM	PMSF

TAE-Puffer

40 mM	Tris
0,11% (v/v)	Essigsäure
1 mM	EDTA

TBS-Puffer

10 mM	Tris
150 mM	NaCl
pH 7,4 einstellen mit HCl	

TBST-Puffer

TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20

2.5 MedienDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), PAA Laboratories

- mit folgenden Zusätzen für HeLa, KB, U251, G55, HeLa Fucci Zellen:

10% (v/v) FKS, 100 μg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin

- mit folgenden Zusätzen für MRC5:

10% (v/v) FKS, 100 μg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin,
1 mM Natriumpyruvat, 1x nichtessentielle Aminosäuren

- mit folgenden Zusätzen für HeLa rtTA:

10% (v/v) tetracyclinefreies FKS, 100 μg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin

LB-Medium

10 g BactoTrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl mit ddH₂O auf 1l auffüllen und autoklavieren

LB-Platten

18,5 g Standard I-Nähragar (Merck) mit ddH₂O auf 0,5l auffüllen und autoklavieren

2.6 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Agilent RNA 6000 Nano/Pico Kit	Agilent Technologies
dNTP Set	New England Biolab, Fermentas
Dialyse Schlauch	Spectrapor MWCO 6000- 8000
DuoSet ELISA Human IL-8	R&D Systems
ECL-Filme (Fuji X-ray Film SUPER RX)	Fujifilm
ECL Western blotting detection reagent	GE Healthcare
Filterpapier	Whatman
Gateway LR Clonase II Enzym Mix	Invitrogen
Hank's BSS	PAA
Immobilion Western Chemiluminescent HRP- Substrate	Millipore
Luminescent β -Galactosidase Detection Kit II	Clontech
RNeasy Mini Kit	Qiagen
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey & Nagel
NucleoBond® PC500 (Maxi Prep Kit)	Macherey & Nagel
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey & Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey & Nagel
pENTR/D-TOPO Cloning Kit	Invitrogen
Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plates	Applied Biosystems
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Protein G-Sepharose	GE Healthcare
PVDF-Membran	Roth
Random Hexamer Primer 100 μ M	Fermentas
Roti®-Quant Bradford-Kit	Roth
TaqMan® PreAmp Cells-to-CT™ Kit	Applied Biosystems
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Fast SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Vivaspin 2 ml Concentrator RC, 10000 MWCO	Vivascience
γ - ³² P-ATP	Perkin Elmer
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare
Zellkulturmaterial	Greiner Bio-One
96-Well F96 MicroWell™ Platten	Thermo Scientific, Nunc
Duolink® Starter Kit	Sigma Aldrich

2.7 Enzyme und Inhibitoren

Xho I (10U/μl)	Fermentas (# ER0691)
Nhe I (10U/μl)	Fermentas (# ER0971)
Bgl II (10U/μl)	Fermentas (# ER0081)
HindIII (10U/μl)	Fermentas (# ER0501)
DpnI (10U/μl)	Fermentas (# ER1701)
NotI (10U/μl)	Fermentas (# ER0591)
Pfu-Polymerase (2,5U/μl)	Fermentas (# EP0501)
Proteinase K (600-1000U/ml)	Fermentas (# EO0491)
RNase A (10mg/ml)	Fermentas (# EN0531)
Fast Digest Sall (10U/μl)	Fermentas (# FD0644)
Fast Digest KpnI (10U/μl)	Fermentas (# FD0524)
T4 DNA Ligase (200CEU/μl)	Fermentas (# EL0014)
T4 Polynukleotid Kinase (PNK; 10U/μl)	Fermentas (# EK0031)
MMLV Reverse Transkriptase (200U/ml)	Fermentas (# EP0352)
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (CIAP; 1U/μl)	Fermentas (# EF0654)
PD332991	Selleck (# S1116)
5Z-7-Oxozeaenol	Tocris (# 66018-38-0)
SB203580	Calbiochem (CAS152121-47-6)

2.8 Standards

DNA-Standard:

GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas

Protein-Standard:

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

2.9 Plasmide, Primer und *TaqMan*-Assays on Demand

Folgende bereits vorhandene Plasmide wurden in dieser Arbeit eingesetzt:

pCR-Blunt II TOPO	Invitrogen
pCS3MT	Dr. P. Holland, London, England
pCDNA3.1	Invitrogen
pSV-β-Gal	Promega
pBSPACΔP	PD Dr. Nourbakhsh, Hannover
pENTR/D TOPO	Invitrogen

pEGFP-C1	Clontech
pGBT9-GW	DKFZ, Heidelberg
pSuper.Puro (pSP)	AG Kracht
pBI-EGFP	Prof. Dr. Schmitz, Gießen
pCDNA3-CDK6-wt	Pierre Roger, Niederlande
pCDNA3-CDK6-S178P	Pierre Roger, Niederlande
Xpress-CyclinD3	Pierre Roger, Niederlande
pCI-Neo-HA-CDK6	Philip Kaldis
pCI-Neo-HA-CDK6T177A	Philip Kaldis
pEGFP-p65	AG Kracht
pCDNA3.-HA-TRIP6	Olivier Kassel
pSuper.Puro-shCDK4	AG Kracht
pSuper.Puro-shCDK6	AG Kracht
pEBB-HA-p65wt	Prof. Dr. Schmitz, Gießen
pCDNA3-T7 His(6)p18INK4c	Michael Naumann
pCDNA3-T7 His(6)p19INK4d	Michael Naumann

Folgende shRNA Plasmide wurden von Sigma bezogen:

shCDK7 (TRCN0000230910, NM_001799.3-464s21c1)
 CCGGGAAACTGATCTAGAGGTTATACTCGAGTATAACCTCTAGATCAGTTTCTTTTTG

shCyclin D1 #1 (TRCN0000288598, NM_053056.2-728s21c1)
 CCGGGAACAAACAGATCATCCGCAACTCGAGTTGCGGATGATCTGTTTGTCTTTTTG

shCyclin D1 #2 (TRCN0000295873, NM_053056.2-778s21c1)
 CCGGCCACAGATGTGAAGTTCATTTCTCGAGAAATGAACTTCACATCTGTGGTTTTTG

shCyclin D1 #3 (TRCN0000295874, NM_053056.2-871s21c1)
 CCGGACAACCTCCTGTCCTACTACCCTCGAGGGTAGTAGGACAGGAAGTTGTTTTTTG

shCyclin D1 #4 (TRCN0000295875, NM_053056.2-904s21c1)
 CCGGTCCTCTCCAGAGTGATCAAGTCTCGAGACTTGATCACTCTGGAGAGGATTTTTG

shCyclin D1 #5 (TRCN0000295876, NM_053056.2-1440s21c1)
 CCGGTGTTGTAAGAATAGGCATTAACCTCGAGTTAATGCCTATTCTTACAACATTTTTG

shCyclin D3 #1 (TRCN0000003826, NM_001760.x-1003s1c1)
 CCGGCAGACCAGCACTCCTACAGATCTCGAGATCTGTAGGAGTGCTGGTCTGTTTTT

shCyclin D3 #2 (TRCN0000003827, NM_001760.x-379s1c1)
 CCGGCGCTGTGAGGAGGAAGTCTTCCTCGAGGAAGACTTCCTCCTCACAGCGTTTTT

shCyclin D3 #3 (TRCN0000003828, NM_001760.x-634s1c1)
 CCGGGCACATGATTTCTGGCCTTCCTCGAGGAAGGCCAGGAAATCATGTGCTTTTT

shCyclin D3 #4 (TRCN0000003829, NM_001760.x-1007s1c1)
 CCGGCCAGCACTCCTACAGATGTCACTCGAGTGACATCTGTAGGAGTGCTGGTTTTT

shCyclin D3 #5 (TRCN0000003830, NM_001760.x-1434s1c1)
 CCGGCTAGGGTTATTGCATTTGGATCTCGAGATCCAAATGCAATAACCCTAGTTTTT

Im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmide:

pBI-EGFP-CDK6-wt
 pBI-EGFP-CDK6-S178P
 pGBT9-GW-CDK6S178P
 pEGFP-CCNI
 pCI-HA-CDK6-shresistent
 pCI-HA-CDK6 T177A-shresistent
 pCI-HA-CDK6 K43R-shresistent
 pSP-shTRIP6 E/F
 pCDNA3.1-HA-TRIP6-S142/147A (TRIP6 SS/AA)
 pCDNA3.1-HA-TRIP6-S135/142/147/153/156A (TRIP6 SSSSS/AAAAA)

Tabelle 2: Sequenzierprimer

Name	Sequenz 5'-3'
CMV-fw	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
CMV-re	AGAAGGACACCTAGTCAGAC
EGFP-C1-fw	GAAGCGCGATCACATGGTC
EGFPC1-re	AACCATTATAAGCTGCAATAAAC
pGEX3-fw	CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG
pGEX5-re	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pSuper.puro_1953_F	GTGTCACTAGGCGGGAACAC
TRIP6-re	TGCTCAGCAAGTCTATCTCG
CDK6-fw	TGCCCGCATCTATAGTTTCC
CDK6-re	GTCCTTCTCCATGGTGAAGG
pBI-EGFP-se	ATCCTCTAGTCAGCTGTCCG
pBI-EGFP-as	GATACAAGGGACATCTTCCC

Die Primer wurden entweder direkt bei LGC Genomics synthetisiert oder von MWG synthetisiert und für die Sequenzierung mitgeschickt.

Tabelle 3: Primer für Klonierungen

Name	Sequenz
CDK6-se	GATCGCTCGAGCAAGCTTACCATGGAGAAGG
CDK6-as	TCGATCGCTAGCATCCCTAGGCTGTATTCAGC
sh-TRIP6-E	GATCCCCTGAGAATTGTTGCTCTGGAttcaagagaTCCAGA GCAACAATTCTCATTTTTGGAAA
sh-TRIP6-F	AGCTTTTCCAAAAATGAGAATTGTTGCTCTGGAtctcttgaaT CCAGAGCAACAATTCTCAGGG
SDM-153-156-A-se	CTCCCTATGGGGGCCCGCTCCAGCCGTTACTACTACC GCCAGCACCC
SDM-153-156-A-as	GGGTGCTGGCGGTAGTGTAAGCGGCTGGAGCGGGGCC

	CCCATAGGGAG
SDM-135-A-se	CCTACCGCACGGGCGCCCTGAAGCCAAATC
SDM-135-A-as	GATTTGGCTTCAGGGCGCCCGTGCGGTAGG
SDM-142-147-A-se	CCCTGAAGCCAAATCCAGCCGCGCCGCTCCCAGCGGCT CCCTATGGGGGCCCC
SDM-142-147-A-as	GGGGCCCCCATAGGGAGCCGCTGGGAGCGGCGCGGCT GGATTTGGCTTCAGGG
CDK6K43R-as	CACCCGCACGCGCCTCAACGCCACGAAAC
CDK6K43R-se	GTTTCGTGGCGTTGAGGCGCGTGCGGGTG
shRNA-resistant- CDK6-se	CCGTGGATCTCTGGAGTGTGGCTGCATATTTGCGAGAT GTTCCGAAGGAAGCCTCTTTTTTCGTGGAAGTTCAG
shRNA-resistant- CDK6-as	CTGAACTTCCACGAAAAAGAGGCTTCCTTCGGAACATCT CGGCAAATATGCAGCCAACACTCCAGAGATCCACGG
pENTR-CDK6-se	CACCATGGAGAAGGACGG
pENTR-CDK6-as	CTAGGCTGTATTCAGCTCCGAG
CCNI-pEGFP-se	GATCGCCTCGAGCAAAGTTTCCAGGGCCTTTG
CCNI-pEGFP-as	GATCGCGGTACCTTCTTCTACAGCCTTTCCTG

Tabelle 4: CHIP-Primer für Real-Time-PCR

Gen	Primer se	Primer as
<i>IL8</i> Promotor	aagaaaactttcgtcatactccg	tggtttttatcatcaccctac
<i>IL8</i> upstream	atcatgggtcctcagaggtcagac	ggtgggagggaggtgttatctaag

Tabelle 5: TaqMan-Assays on Demand, Applied Biosystems

Name	Accession Number	Assay ID
<i>hACTB</i>	NM_0011101.3	Hs99999903_m1
<i>hGUSB</i>	NM_000181.3	Hs99999908_m1
<i>hIL8</i>	NM_000584.3	Hs00174103_m1
<i>hIL6</i>	NM_000600.3	Hs00174131_m1
<i>hCCND1</i>	NM_053056.2	Hs00277039_m1
<i>hCXCL3</i>	NM_002090.2	Hs00171061_m1
<i>hCCL20</i>	NM_004591.2	Hs00171125_m1
<i>hNFKBIA</i>	NM_020529.2	Hs00153283_m1
<i>hCDK6</i>	NM_001145306.1NM_001259.6	Hs01026372_m1
<i>hTRIP6</i>	NM_003302.2	Hs00377979_m1
<i>hCDK4</i>	NM_000075.3	Hs01565683_g1

Custom TaqMan-Assay: *hAG1* (Geminin): se GCACCGCCACCAGCAA
as GTGCCGTCGAACCTGATGT

2.10 Antikörper und rekombinante Proteine

Primärantikörper

- anti- β -Aktin (JLA20, Calbiochem), 1:10000 in TBS-T, 5% Milch

- anti-Tubulin (sc-8035, Santa Cruz), 1:1000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-GFP (Roche; 11814460001), 1:000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-T7 (Novagen; 69522-3), 1:0000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-IkBa (9242, Cell Signaling), 1:1000 in TBS-T
- anti-cFOS (sc-7202, Santa Cruz), 1:000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-NFkB p65 (sc-372, C-20; sc-8008,F-6, Santa Cruz),1:1000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-phospho-NFkB p65 Ser536 (3033, 3031, Cell Signaling, 1:1000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-Cyclin D3 (2936 Cell Signaling),1:2000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-Cyclin D1 (sc-718, M20 Santa Cruz), 1:1000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-CDK6 (sc-177, C21; DCS-90; sc-56282, Santa Cruz; ab54576 Abcam), 1:10000 (sc-177) bzw. 1:1000 (DCS-90) in TBS-T, 5% BSA
- anti-CDK4 (sc-260, C22 Santa Cruz), 1:1000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-TRIP6 (A300-335A Bethyl; H-95, sc-292303; G-5, sc-376550 Santa Cruz; ab12329 Abcam), 1:4000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-CDK7 (sc-7344, C4; sc-529, C19 Santa Cruz), 1:1000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-Maus-IgG (sc-2025 Santa Cruz)
- anti-Kaninchen-IgG (sc-2027 Santa Cruz; 2729 Cell Signaling)
- anti-Histon H3 (9718 Cell Signaling), 1:1000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-Pol II (07-352 Millipore)
- anti-phospho Pol II S2 (ab5095 Abcam), 1:000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-p38 (SAK7) (Rzeczkowski et al. 2011), 1:000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-phospho-p38 T180/Y182 (36-8500 Zymed), 1:000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-TAK1 (4505 Cell Signaling),1:000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-phospho-TAK1 T187 (4536 Cell Signaling),1:500 in TBS-T, 5% BSA
- anti-cJun (sc-1694, H-79 Santa Cruz),1:000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-phospho-cJun Ser63 (9261 Cell Signaling),1:000 in TBS-T, 5% BSA
- anti-HSP27(G31, 2402S Cell Signaling), 1:000 in TBS-T, 5% Milch
- anti-phospho-HSP27 Ser82 (2406 Cell Signaling), 1:000 in TBS-T, 5% Milch

Sekundärantikörper

α -Kaninchen IgG-POD (aus Esel), Dako

α -Maus IgG-POD (aus Schaf), Dako

α -Maus IgG-Cy3-Antikörper (aus Esel), Millipore

α -Kaninchen IgG-Cy3-Antikörper (aus Esel), Chemicon International

α -Maus IgG (ganzes Molekül)-FITC-Antikörper (aus Ziege), Sigma

α -Kaninchen IgG (ganzes Molekül)-FITC-Antikörper (aus Ziege), Sigma

α -Maus IgG TrueBlot, α -Kaninchen IgG TrueBlot, Bioscience

Rekombinante Proteine

humanes, rekombinantes IL-1 α	Prof. Dr. Saklatvala, London, England
humanes, rekombinantes TNF α	R&D Systems oder Hoelzel
humanes, rekombinantes GST-TRIP6	Fang-Tsy Lin
humanes, rekombinantes GST-RB ₇₇₃₋₉₂₈	Päivi Ojala
humanes, rekombinantes GST-CDK6	Yue Xiong
humanes, rekombinantes GST	AG Kracht

2.11 Bakterienstämme

E. coli-Stamm TOP10 (Invitrogen)

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

E. coli-Stamm XL1-Blue (Invitrogen)

Genotyp: F' *Tn10*(*Tet*^r) *proA* +B + *lacI*^q Δ (*lacZ*)M15I *recA1* *gyrA96* (*Nal*^r) *tbi-1bsdR17* (*r*_k⁻ *m*_k⁻) *glnV44* *relA1* *lac*

E. coli-Stamm BL21-AI (Invitrogen)

Genotyp: F⁻ *ompT* *hsdSB* (rB-mB⁻) *gal* *dcm* *araB::T7RNAP-tetA*

E. coli-Stamm One Shot[®] *ccdB* Survival[™] 2 T1^R (Invitrogen)

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* *fhuA::IS2*

Verwendete Antibiotika:

Ampicillin (100 μ g/ml), Kanamycin (50 μ g/ml), Doxycyclin (2 μ g/ml), Puromycin (1 μ g/ml)

2.12 Zelllinien

HeLa: humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen (von ATCC)

KB: orale epidermale Karzinomzellen (Ziesche et al. 2013)

MRC5: humane primäre Lungenfibroblasten (von ATCC)

U251: humane neuronale Glioblastomzelllinie (Astrocytom) (von ATCC)

G55: humane Glioblastomzelllinie (Westphal et al. 1994)

HeLa Fucci Zellen: HeLa Zelllinie stabil transfiziert mit rot- und grün-fluoreszierenden Zellzyklus-Markergenen (mKO2-hCdt1(30/120), mAG-hGeminin (1/110)) (von A. Miyawaki; Sakaue-Sawano et al. 2008)

HeLa rtTA: transgene HeLa-Zelllinie, stabil transfiziert mit dem pTet-On-Regulatorplasmid, welches den reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator kodiert (von Clontech)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxipräparation)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinerem Maßstab (Minipräparation) oder in größerem Maßstab (Maxipräparation) wurde das entsprechende Kit der Firma Macherey & Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden die transformierten Bakterien zunächst in 4 ml (Minipräparation) bzw. 150 ml (Maxipräparation) LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für 6-8 h bzw. über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Nach Pelletierung durch Zentrifugation wurde die Bakterienkultur in Resuspensionspuffer aufgenommen und nach Herstellerangaben weiter verarbeitet. Je nach gewünschter Konzentration wurde die DNA bei der Mini-Präparation mit 30-50 µl ddH₂O und bei der Maxi-Präparation mit 200 µl ddH₂O eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *NucleoSpin[®] RNA II Kit* von Macherey & Nagel oder dem *RNeasy Mini-Kit* von Qiagen. Die Zellen wurden je nach Menge in verschiedenen Volumina an Lysepuffer aufgenommen und mit Hilfe einer Filtersäule homogenisiert. Nach der Bindung an eine Silikamembran und mehreren Waschschritten wurde die RNA in 30-60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die RNA Konzentration mittels NanoDrop gemessen.

3.1.2 PCR (Polymerasekettenreaktion) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die Annealingtemperatur wurde an das jeweilige Primerpaar angepasst. Die PCR-Reaktion wurde im folgenden Standardansatz durchgeführt:

50-100 ng	Template
1x	10x Puffer (ohne MgSO ₄)
0,5 mM	Primer <i>sense</i>
0,5 mM	Primer <i>antisense</i>
0,2 mmol/L pro Nukleotid	dNTP-Mix

2 mM	MgCl ₂
5% (v/v)	DMSO
2,5 U	Pfu-Polymerase
ad 25 µl	Wasser

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

Tabelle 6: Generelles Temperaturprofil der PCRs

	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	95°C	1min	1
Denaturierung	95°C	1min	35
Anlagerung der Primer	54-70°C	1min	
Elongation	72°C	0,5min/kb (Pfu)	
finale Elongation	72°C	12min	1

3.1.3 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Bei einer RT-PCR wird RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für das Umschreiben der gesamten RNA und der Amplifikation der cDNA wurde ein Gemisch aus Random-Hexamer-Primern und der MMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) Reversen Transkriptase verwendet.

Ein 20 µl RT-PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

14,5 µl	1 µg RNA in RNase-freiem H ₂ O
4 µl	5xRT-Puffer
0,5 µl	Random Hexamer Primer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	MMLV Reverse Transkriptase

Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Tabelle 7: RT-PCR Temperaturprofil

Temperatur (°C)	Zeit (min)
23	10
37	60
95	5
4	∞

Die cDNA-Proben wurden direkt bei der Real Time RT-PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.1.4 Real Time RT-PCR

Die Real Time RT-PCR ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR durch Messung von Fluoreszenzsignalen. Die Firma Applied Biosystems bietet für die exakte Detektion und Quantifizierung sogenannte *TaqMan-Assays on Demand* an, die aus herkömmlichen PCR-Reagenzien und einer TaqMan-Sonde bestehen. Diese Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff FAM (Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende den Quencher TAMRA (Tetramethylrhodamin). Die Sonde bindet spezifisch während der PCR an eine komplementäre Sequenz des Matrizenstranges. Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher wird die lichtinduzierte Fluoreszenz des Reporters durch einen Fluoreszenzenergietransfer (FRET) auf den Quencher übertragen und kann deshalb nicht gemessen werden. Während der Synthese des komplementären DNA-Stranges trifft die DNA-Polymerase auf die Sonde und verdaut diese. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, wodurch das Quenching aufgehoben wird und die Fluoreszenz des Reporters detektiert werden kann. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei direkt abhängig von der Menge an amplifizierter DNA und kann deshalb zur Ermittlung der Ausgangsmenge verwendet werden. Gemessen wurden die Real Time RT-PCR-Daten mit dem *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System*.

Ein 20 µl Real Time RT-PCR Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

10 µl TaqMan FAST 2xUniversal PCR Master Mix
 7,5 µl Nuklease-freies H₂O
 0,5 µl *TaqMan Assays on Demand*
 2 µl cDNA

Tabelle 8: Real Time RT-PCR Temperaturprofil

	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	95°C	20sek	1
Denaturierung	95°C	3sek	40
Annealing/Elongation	60°C	30sek	

Die eingesetzten cDNA-Proben wurden im 96-well-Format als Doppelwerte pipettiert. Die Auswertung der Daten erfolgte als relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode, bei der die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen (*housekeeping gene*, β -actin, β -Glucuronidase und Geminin) normalisiert wird. Anschließend wurden die behandelten Proben auf eine unbehandelte Probe bezogen.

Eine weitere Möglichkeit der quantitativen Echtzeitanalyse der PCR beruht auf dem Cyanin-Farbstoff SYBR Green. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet an

doppelsträngige DNA. Dabei korreliert die Zunahme doppelsträngiger-DNA mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Da SYBR Green an jede doppelsträngige DNA bindet, wird am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Amplifikation unspezifischer DNA-Fragmente auszuschließen.

Die ChIP-Experimente (siehe 3.1.14) beruhen auf der SYBR Green Real Time RT-PCR. Ein 20 µl Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

2 µl	ChIP-bzw. Input-DNA (1:10)
10 µl	Fast Sybr Green Mastermix (2x)
0,25 µM	Primer se
0,25 µM	Primer as

Das PCR-Programm ist in Tab.8 aufgeführt. Mit den gemessenen ct-Werten wurde mit folgender Formel berechnet, wie viel DNA des eingesetzten Inputs die einzelnen Proben aufweisen: %-Input= $2^{-(Ct_{Probe}-Ct_{Input})}$

3.1.5 Klonierung verschiedener Vektoren

Für die Generierung der unter 2.9 aufgeführten Vektoren wurde das zu klonierende Fragment mittels PCR spezifisch amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten dabei Anhänge mit spezifischen Erkennungssequenzen der jeweils verwendeten Restriktionsenzyme. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit* von Macherey & Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 20 µl Elutionspuffer eluiert. Das komplette Eluat wurde mit 2 µl der jeweiligen Fast-Digest-Enzyme und 2,5 µl 10x-Fast-Digest-Puffer versetzt und 2 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde der Verdau gestoppt und 10 min bei 80°C inaktiviert.

Zeitgleich wurde der entsprechende Zielvektor vorbereitet. Zu 4 µg Vektor-DNA wurden je 1 µl der Enzyme und 2 µl 10x-Fast-Digest-Puffer gegeben, auf 20 µl mit Bideest aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Um eine Re-Ligation des Vektors zu vermeiden, wurde dieser mit 1 µl *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) und 2 µl 10x-CIAP-Puffer dephosphoryliert und 1 h bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 20 min bei 80°C inkubiert. Sowohl Vektor als auch Amplifikat wurden danach mit entsprechenden Mengen 6x-Gel-Loading-Dye vermischt, auf ein 0,8%iges EtBr-freies Agarosegel aufgetragen und bei 100V aufgetrennt. Das Gel wurde ca. 15 min mit einer 0,02%igen Methylenblaulösung (in Bideest) unter Schütteln gefärbt und anschließend mit Bideest entfärbt bis die Banden deutlich sichtbar waren. Diese wurden dann mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und jeweils mit dem

NucleoSpin®Gel and PCR Clean-Up Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl eluiert. Mit dem Nanodrop-Photometer konnte die Konzentration bestimmt werden. Für die Ligation wurden Vektor und Amplifikat im molaren Verhältnis 1 zu 3 in 10 µl Gesamtvolumen gemischt. Folgender Ansatz wurde für die Ligation verwendet:

10 µl Vektor:Insert 1:3
 2 µl 10x-Ligasepuffer
 1 µl 10mM ATP
 1 µl T4-DNA-Ligase
 Ad 20 µl ddH₂O

Als Kontrollansatz diente eine Ligation, die Wasser anstatt des Inserts enthielt. Die Ansätze wurden 15 min bei RT inkubiert. Je 2 µl des Ligationsansatzes wurden für eine Transformation in TOP10 verwendet (siehe 3.1.10). Am nächsten Tag wurden 5-10 Klone gepickt, um je 4 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) anzupflanzen und für 6-8 h bei 37°C schüttelnd zu inkubieren. Die Kulturen wurden aufgereinigt (siehe 3.1.1) und die DNA bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde je 1 µg DNA pro Plasmid in einen Kontrollverdau eingesetzt und auf Vorhandensein des Inserts in einem 1%igen Agarosegel überprüft. Die positiven Klone wurden anschließend zum Sequenzieren versendet (siehe 3.1.13).

3.1.6 Klonierung von shRNA

Für die Generierung vom pSuper-Puro-shTRIP6 Plasmide wurde die in Tabelle 3 aufgeführte shRNA in den mit BglIII/HindIII geschnittenen Vektor kloniert. Zum Annealen der Oligos wurden je 1 µl Stocklösung der Oligos (forward+reverse) mit 48 µl Annealingpuffer (T4 PNK Puffer A) gemischt und erst für 4 min bei 95°C, dann 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Die Oligos wurden entweder sofort genutzt oder bei -20°C gelagert. Für die Phosphorylierung der Oligos wurde folgender Ansatz verwendet:

2 µl Oligos
 1 µl T4 PNK Puffer A
 1 µl 1mM ATP
 1 µl T4 Polynukleotidkinase (PNK)
 5 µl ddH₂O

Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 70°C inaktiviert. Der mittels BglII/HindIII linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde mit dem *NucleoSpin®Gel and PCR Clean-Up* Kit (Macherey & Nagel) aufgereinigt. Für die Ligation des Vektors mit den Oligos wurde folgender Ansatz verwendet:

2 µl phosphorylierte Oligos
 3 µl pSuper-Puro verdaut mit BglII und HindIII
 1 µl T4 Ligase
 1 µl Ligasepuffer
 ad 10 µl ddH₂O

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Wasser anstatt der dsOligos. Um die Anzahl negativer Klone zu reduzieren wurde 1 µl BglII hinzugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert. Der komplette Ligationsansatz wurde für eine Transformation in TOP10-Zellen verwendet. Am nächsten Tag wurden Minipräparationen mit Klonen von der Agarplatte angeimpft und ein Kontrollverdau mit EcoRI und HindIII durchgeführt. Positive Klone zeigen ein 285bp großes Fragment, leere Vektoren weisen ein Fragment von 221bp auf. Die positiven Klone wurden zum Sequenzieren versendet (siehe 3.1.13).

3.1.7 Mutagenese

Zur Herstellung von Punkt- oder Deletionsmutanten wurden Primer generiert, welche die Mutation enthalten und in einer PCR mit der zumutierenden DNA eingesetzt. Die methylierte Matrizen-DNA (DNA aus Bakterien wird in den meisten Stämmen methyliert) wurde selektiv durch einen DpnI-Verdau abgebaut. Anschließend wurde die neu synthetisierte unmethylierte DNA, die nun die Mutation enthält, in Bakterien transformiert (siehe 3.1.10).

Eine Mutagenese-PCR hatte folgenden Ansatz:

50 ng	Template
1x	10x Pfu-Puffer (mit MgSO ₄)
125 ng	Primer <i>sense</i>
125 ng	Primer <i>antisense</i>
0,2 mmol/l pro Nukleotid	dNTP-Mix
2,5 U	Pfu-Polymerase

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Tabelle 9: Mutagenese-PCR Temperaturprofil

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30sek	1
Denaturierung	95°C	30sek	16
Annealing	55°C	1min	
Elongation	68°C	2min/kb (Pfu)	

Positive Klone wurden mittels Sequenzierung nachgewiesen.

3.1.8 Klonierung mit der Gateway®-Rekombinations-Strategie

Im Gegensatz zur klassischen Klonierung ermöglicht die Gateway®-Methode eine schnelle Klonierung von Genen unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Die Gateway®-Klonierung nutzt das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Nach der Infektion wird das Phagenchromosom in das Bakteriengenom integriert und von "attachemt" (*att*)-Bereichen flankiert. Der Zielvektor enthält *attR1*- und *attR2*-Stellen. Die für die Rekombination notwendigen homologen Bereiche *attL1* und *attL2* befinden sich im Eingangsvektor (Entry-Vektor). Zuerst wird das zu untersuchende Gen über Schnittstellen in den Entry-Vektor kloniert. Durch homologe Rekombination zwischen *attL1* und *attL2* des Entry-Vektors mit *attR1* und *attR2* des Ziel-Vektors wird ein Expressionsplasmid mit dem Zielgen generiert. Eine gerichtete Klonierung ist in diesem Fall sicher gestellt, da *attL1* nur mit *attR1* und *attL2* mit *attR2* rekombiniert. Durch die unterschiedlichen Resistenzen von Entry- und Ziel-Vektor ist die Selektion positiver Klone sehr einfach. Da in der *attR*-Kassette das *ccdB*-Gen integriert ist, welches toxisch wirkt, wachsen nach der Transformation des Rekombinationsansatzes nur Bakterien, welche ein Expressionsplasmid enthalten.

Diese Klonierungsmethode wurde in der Arbeit angewendet, um den Vektor für den Y2H-Screen herzustellen. Als Entry-Vektor wurde der pENTR™/D-TOPO und als Ziel-Vektor der eukaryotische Expressionsvektor pGBT9-GW verwendet. Zunächst wurde das zu klonierende Insert CDK6 S178P mit spezifischen Primern (siehe 2.9) amplifiziert. Danach wurde der PCR Ansatz mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit* von Macherey & Nagel aufgereinigt und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Der TOPO-Entry-Vektor und das aufgereinigte Insert wurden laut Herstellerangaben gemischt:

15 ng/μl pENTR/D-TOPO (2,5kB): 1μl
 6 ng PCR-Produkt (1kB): 4μl
 ad 6 μl H₂O

Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz in *One Shot[®] Competent E.coli-Zellen* transformiert. Positive Klone wurden über einen Restriktionsverdau mit NotI bestimmt. Für den Einbau des Inserts aus dem Entry-Vektor in den Ziel-Vektor wurde folgende Reaktion durchgeführt:

1-7 μl	Entry-Vektor (150ng/Reaktion)
1 μl	Ziel-Vektor (150ng/μl)
2 μl	LR Clonase II Enzym Mix
ad 8 μl	TE-Puffer (pH 8,0)

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 25°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1 μl Proteinase K (2 μg/μl) für 10 min bei 37°C inaktiviert. 1 μl des Rekombinationsansatzes wurde für die Transformation in chemisch kompetente *One Shot[®] Competent E.coli-Zellen* verwendet. Positive Klone wurden mittels Sequenzierung überprüft.

3.1.9 Transformation

Zur Transformation wurden die unter 2.11 aufgeführten chemisch kompetenten *E.coli* Stämme verwendet. Dafür wurden 100 μl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 2 μl Ligationsansatz bzw. 10-100 ng Plasmid vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42°C im Heizblock und anschließend eine Inkubation für 5 min auf Eis. Zu den Bakterien wurden dann 700 μl LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben und 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Je 20 μl und 200 μl wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.10 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 50-150 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (4°C, 3000 rpm, 10 min) und in 1/10 Volumen TSS (*transformation and storage solution*; 10% Polyethylenglykol 6000, 5% DMSO, 50mM MgSO₄·7H₂O ad 25 ml LB-Medium) bei 4°C resuspendiert.

Anschließend wurde die Suspension á 100 µl in 1,5 ml Gefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.1 Dauerkulturen von Bakterien

Für die Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen wurden diese bei -80°C als Glycerin-Dauerkultur gelagert. Die Kulturen wurden mit 1 Volumen Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.12 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics durchgeführt. Die Proben wurden nach Angaben verschickt. Dafür wurden 40 µl mit 100 ng/µl des entsprechenden Plasmids geliefert. Falls notwendig, wurde der Sequenzierprimer dazupipettiert.

3.1.13 Laser-Mikrodissektion und Einzel-Zell-qRT-PCR

Zur gezielten Untersuchung von Einzelzellen mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion (LMD) wurde eine definierte Zellmenge in Willco-Schalen (30 mm Durchmesser mit einer 2 µm Polytehylenphthalat (PEN)-Membran) ausgesät. Am Ende der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und unmittelbar danach für 1 h bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Mit Hilfe des *Leica LMD6000 Systems* wurden die Zellen detektiert, mit dem Laser ausgeschnitten, im Deckel eines 0,2 ml PCR-Gefäßes gesammelt und die Anzahl der Zellen anschließend überprüft. Die Zellen wurde dann lysiert und die mRNA-Expression mit dem *TaqMan® PreAmp Cells-to-CT™ Kit* (ABI) ermittelt. Hierfür wurde eine adaptierte Version des Kits verwendet. Die Zellen wurden direkt im Deckel durch Zugabe von 12,5 µl des folgenden Ansatzes lysiert:

13,375 µl	Lysepuffer
0,125 µl	DNase

Nach gründlichem Vortexen, kurzem Abzentrifugieren und 5 min Inkubation bei RT wurden 1,25 µl Stopplösung dazugegeben und nochmals kurz gevortext. Die gewonnenen Lysate wurden bei -80°C gelagert oder direkt auf Eis weiterverarbeitet. Im nächsten Schritt erfolgte das Umschreiben der mRNA im Lysat in cDNA. Im Gegensatz zur herkömmlichen RT-Reaktion erfolgt diese ohne vorherige RNA-Isolation.

Das Komplettvolumen der RT-Reaktion beträgt 10 µl, bestehend aus:

5,0 µl RT-Buffer
 0,5 µl 20x RT-Enzym Mix
 4,5 µl Lysat

Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Tabelle 10: RT-PCR Cells-to-Ct-Kit

Temperatur (°C)	Zeit (min)
37	60
95	5
4	∞

Im nächsten Schritt wurden genspezifische Primer benutzt, um das RT-Produkt zu preamplifizieren. Die Primer wurden auch für die darauffolgende Real Time RT-PCR verwendet. Für diesen PCR-Schritt wurden die *Assay-On-Demand*-Sonden 1:100 in TE-Puffer verdünnt eingesetzt. Folgende Komponenten wurden verwendet:

5 µl TaqMan PreAmp MasterMix
 2,5 µl gepoolter, 1:100 verdünnter Sonden-Mix
 2,5 µl cDNA (obiges RT-Produkt)

Tabelle 11: PreAmp-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10min	1
95°C	15sek	
60°C	4min	15

Die Proben wurden bei -20°C gelagert oder direkt für eine RealTime RT-PCR verwendet. Dafür wurden die Preamplifikationsprodukte 1:5 in TE-Puffer verdünnt.

Ein 20 µl Real Time RT-PCR Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

10 µl TaqMan FAST 2xUniversal PCR Master Mix
 5 µl Nuklease-freies H₂O
 1 µl *TaqMan Assays on Demand*
 4 µl 1:5 verd. PreAmp-RT-Produkt

Die eingesetzten Proben wurden im 96-well-Format als Doppelwerte pipettiert. Die Messung erfolgte mit dem *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System* mit den in Tabelle 8 aufgeführten Parametern. Die Auswertung der Daten erfolgte als relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

3.1.14 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Um eine Bindung von Proteinen an das Chromatin nachzuweisen, wurden ChIP-Experimente durchgeführt. Die Protein-DNA-Bindung wurde *in vivo* mit 1% Formaldehyd, welches direkt zum Medium gegeben wurde vernetzt (*crosslinking*). Dieser Vorgang wurde nach 10 min Inkubation bei RT mit 0,1 M Glycin und einer Inkubation für 5 min gestoppt. Die Zellen wurden geerntet und für 5 min bei 3000 rpm (4°C) zentrifugiert, in kaltem PBS mit 1 mM PMSF gewaschen und nochmals für 5 min bei 3000 rpm (4°C) zentrifugiert. In 3 ml ChIP-Lysepuffer wurden die Zellen anschließend für 10 min auf Eis lysiert. Zur Fragmentierung der DNA wurden die Lysate sonifiziert (28x30sek Ultraschall/30sek Pause jeweils; *Biorupter*, Diagenode) und nochmals bei 13200 rpm für 15 min (4°C) zentrifugiert. Das Chromatin im Überstand wurde in 1,5 ml Gefäße aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 20 µl Chromatin in 100 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A verdünnt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden 3,8 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 1% SDS hinzugefügt und für weitere 2 h bei 37°C mit anschließender Inkubation bei 65°C über Nacht inkubiert. Die Proben wurden in zweifachem Volumen des NTB Puffers (Macherey & Nagel) aufgenommen und die DNA wurde mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit* (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach der DNA-Elution in 50 µl 5 mM Tris (pH8,5) wurde die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Für den folgenden ChIP-Assay wurden pro Antikörper 25 µg Chromatin eingesetzt. Für die Vorreinigung (Pre-clearing) des Chromatins wurde dieses mit einer 50%igen Lösung aus Protein A- und Protein G- Sepharose (30 µl pro Ansatz, in ChIP-Dilutionspuffer äquilibriert), 1 mg/ml IgG und 900 µl Dilutionspuffer für 2 h rotierend bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde im Anschluss für 1 min bei 2000 rpm (4°C) zentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Gefäße überführt. Die gewünschte Menge an Antikörper wurde dazugegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden erneut 30 µl pro Ansatz Protein A/G Sepharose Beads in ChIP-Dilutionspuffer äquilibriert, zu den Proben gegeben und erneut für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurden die Beads mit dem gekoppelten AK-Protein-Gemisch durch Zentrifugation pelletiert und für 5 min rotierend bei 4°C mit verschiedenen Puffern gewaschen. Die Beads wurden

nach dem letzten Waschschrift in 100 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A resuspendiert. Parallel dazu wurden 1/10 (2,5 µg) des Chromatins (Input-Kontrolle) in 100 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A verdünnt. Nach Inkubation von 30 min bei 37°C wurden 3,8 µl Proteinase K (20mg/ml) und 1% SDS hinzugefügt und sowohl der Input als auch die Immunpräzipitate wurden für 2 h bei 37°C und anschließend bei 65°C (über Nacht) inkubiert. Die Proben wurden im zweifachen Volumen des NTB-Puffers (Macherey & Nagel) aufgenommen und die DNA wurde mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit* (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach der DNA-Elution in 50 µl 5 mM Tris (pH 8,5) wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Wie unter 3.1.5 beschrieben, wurden die DNA-Proben mittels Real Time RT-PCR quantifiziert.

3.1.15 Microarray-basierende mRNA-Expressionsanalyse

Für die durchgeführten Microarrays wurde RNA aus Zellen isoliert (siehe 3.1.1). Die Microarray Analyse wurde von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, MHH) durchgeführt. Der verwendete "Whole Human Genome Oligo Microarray" (G4112F, AMADID 014850, Agilent Technologies) enthält 45015 Oligonukleotidsonden. Die cRNA-Synthese wurde mit dem "Quick Amp Labeling kit, one color" (#5190-0442, Agilent Technologies) durchgeführt. cRNA Fragmentierung, Hybridisierung und Waschschriffe wurden wie in: One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol V5.7 (Agilent Technologies, 2008) beschrieben durchgeführt.

Die Daten wurden mit Excel und Genespring GX von Dr. Axel Weber, AG Kracht, und Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, MHH) analysiert.

Für die Ergebnisse, die in Abbildung 13 und 19 gezeigt sind, wurden Transkripte, die bei zwei verschiedenen Bedingungen unterschiedlich exprimiert wurden, durch ein mehrstufiges Filterungsverfahren des relevanten Datensets identifiziert. Gene wurden als reguliert definiert, wenn die Messung folgende Kriterien erfüllte: 1) Der arithmetische Mittelwert der Anti-Log₂-transformierten Intensitätswerte, berechnet aus allen Proben des entsprechenden Vergleichs, war > 100. 2) Der *fold change*-Wert zwischen zwei zu vergleichenden Bedingungen war durchweg bei jedem einzelnen Vergleich > 2 (wenn n = 2) oder 1,5 (wenn n = 4). 3) Alle Messungen im hochregulierten Zustand waren von guter Qualität (wurden von der GeneSpring Software nicht als *compromised* angezeigt). 4) Nur Gensonden die sich auf Transkripte mit EntrezGeneIDs bezogen wurden in die finale Analyse einbezogen. 5) Die Filterung wurde unabhängig für jedes Regulationsereignis auf dem Level der

Gensondenmessung durchgeführt. In Fällen, bei denen mehr als eine Sonde gegen das entsprechende Transkript die Filterkriterien erfüllte, wurde der Wert der Sonde für die Visualisierung der Heatmap und Berechnung der CDK4/6-Abhängigkeit verwendet, der die höchste mittlere Intensität aus allen 71 Datensets aufwies. 6) Die finale Genset-Zusammenstellung und die Erstellung der Venn-Diagramme, wurden für Einzelgenwerte durchgeführt. Die Heatmaps wurden mittels Excel 2003 erstellt. Die Farbcodes für die *fold change*-Werte wurden durch das Ausführen von Visual basic-Macros zugewiesen, die von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz an der "Zentralen Forschungseinrichtung Transcriptomics" der Medizinischen Hochschule Hannover programmiert wurden.

Die Gene-Ontology Analyse wurde mit GO-Elite (Zambon et al. 2012) für 124 Gene gegen 19644 Gene der Microarray-Plattform (die eine EntrezGeneID besaßen) durch die Verwendung folgender Einstellungen durchgeführt: filter_method, z-score; z_threshold, 1.96; permutate_P_threshold, 0.05; permutations, 10,000.

3.1.16 Zellzyklusanalyse mittels FACS

Für die Analyse von Zellzyklusparametern wurden die behandelten Zellen durch Inkubation mit Triplex Express (Gibco) abgelöst und anschließend für 5 min bei 1300 rpm und 4°C pelletiert. Danach wurden das Pellet in 1 ml 70% (v/v) Ethanol resuspendiert und mindestens für 1 h auf Eis fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Eine definierte Anzahl von Zellen wurde in 500 µl Färbelösung (RNase (200 µg/ml), Triton-X100 (0,1% (v/v), Propidiumiodid (20 µg/ml)) resuspendiert. Die Propidiumiodid-gefärbte DNA wurde im FL-2 Kanal des FACSCalibur Gerätes mit der CELLQuest Software (Becton-Dickinson, Heidelberg) detektiert. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse führte Julian Rodriguez (AG Schmitz, Biochemie, Giessen) durch.

3.1.17 Yeast Two-Hybrid Screen (Y2H-Screen)

Der Y2H-Screen (Hefe-Zwei-Hybrid-System) ermöglicht die Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* (Fields and Song 1989). So ist es möglich, in einem empirischen Ansatz mit einer cDNA-Genbank ("Prey") eines bestimmten Gewebes noch unbekannte mögliche Interaktionspartner eines zu untersuchenden Proteins zu identifizieren. Dieses Verfahren bedient sich dabei der natürlichen Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren in Hefe, in der Regel der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Der Transkriptionsfaktor GAL4 weist zwei verschiedene Domänen auf, eine für die Bindung an die DNA (GAL4-BD, Bindedomäne) und eine, die die Transkription aktiviert (GAL4-AD,

Aktivierungsdomäne). Werden diese beiden, auf zwei Plasmiden getrennt exprimierten Domänen, in räumliche Nähe gebracht, wie es durch mögliche Protein-Protein-Interaktionen der Fall sein kann, ist die Funktion des GAL4-Transkriptionsfaktors wieder hergestellt. Durch die Expression eines Reportergens kann die Interaktion detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein Y2H-Screen Service der *Genomics & Proteomics Core Facility* DKFZ (Deutsche Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft, Heidelberg) durchgeführt. Hierfür wurde die cDNA des zu untersuchenden Proteins in einen für das System verwendbaren Vektor pGBT9-GW kloniert und verschickt. Dieser Vektor kodiert für ein Hybridprotein, welches aus der GAL4-BD und CDK6-S178P besteht, für das ein potentieller Bindungspartner gefunden werden sollte ("*Bait-Protein*", Köderprotein). Das verwendete "*Prey-Protein*" (Beuteprotein) bestand aus der GAL4-AD und verschiedener cDNA-Bibliotheken (ORF-Library, HeLa-Library, *bone marrow*-Library, *human universal*-Library).

3.1.18 KinomeView-Analyse

Um mögliche neue Proteine zu finden, die Substrate von CDK6 sind, wurden zwei Service-Leistungen von *Cell Signaling Technology*[®] (CST) in Anspruch genommen.

Der KinomeView ist ein Westernblot-Service, bei dem 17 Antikörper mit unterschiedlichen Phosphorylierungserkennungsmotiven genutzt werden, um einen allgemeinen Überblick über den Phosphorylierungsstatus durch Proteinkinasen zu bekommen. Die verwendeten Antikörper und deren Erkennungssequenz sind in Tabelle 12 aufgeführt. In dieser Arbeit wurden 14 Proben nach Anleitung von CST generiert und verschickt. Die weitere Aufarbeitung und Analyse der Proben mittels Westernblot (*LI-COR Odyssey NIR Imaging System*) wurde von CST durchgeführt.

Tabelle 12: Im KinomeView verwendete Phospho-Motiv-Antikörper.

Antikörper (CST)	Bindemotiv
Phospho-Akt-Substrat (#9614)	RXXS*/T*
Phospho-Akt Substrat (#23C8D12)	RXRXX(S*/T*)
Phospho-(Ser/Thr) AMPK Substrat (#5759)	(L/M)XRXX(S*/T*),RXX(S*/T*)
Phospho-(Ser) ATM/ATR Substrat (#9607)	S*Q
Phospho-(Ser/Thr) ATM/ATR Substrat (#6966)	(S*/T*)QG, (S*/T*)Q
Phospho-(Ser) CDKs Substrat (#2324)	(K/R)sPX(K/R)
Phospho-(Ser/Thr) CK Substrat (#BL4176)	t(D/E)X(D/E)
Phospho-MAPK Substrat (#2325)	PXsP
Phospho-(Ser/Thr) PDK1 Docking Motif (#9634)	(F/Y)(s/t)(F/Y)
Phospho-PKA Substrat (#9624)	(K/R)(K/R)X(s/t)

Phospho-PKC Substrat (#2261)	(K/R)XsX(K/R)
Phospho-PKD Substrat (#4381)	LXRX(s/t)
Phospho-PLK Binding Motif (#A7907)	StP
Phospho-Thr-Pro Motif (#BL4180)	tP
Phospho-Thr-Pro-Glu Motif (#C32G12)	tPE
Phospho-Thr-X-Arg Motif (#2351)	tXR
Phospho-Tyrosine (#9411)	y

3.1.19 Phospho-Scan-Analyse für CDK Substrate

Der im KinomeView eingesetzte CDK-Substrat-Antikörper ((K/R)sPX(K/R)) wurde für den Phospho-Scan-Service von CST genutzt. Hierbei werden posttranskriptionelle Modifikationen, in diesem Fall Phosphorylierungen, quantitativ mittels Massenspektrometrie analysiert. Die HeLa pS-Zellen und HeLa-pS-shCDK6-K06-Zellen (Arrest, G1 Release +/- IL-1) wurden laut Cell Signaling-Anleitung lysiert. Die gefrorenen Proteinextrakte (mit einer Konzentration von 4mg/ml) wurden auf Trockeneis zu CST verschickt. Die Proteinextrakte wurden zuerst mit Proteasen verdaut und fraktioniert. Um die spezifischen Phosphorylierungsstellen anzureichern, wurden die Proben danach mit dem phospho-(Ser) CDK Substratantikörper (CS#2324), welcher gegen das Phosphorylierungsmotiv (K/R)(S*)PX(K/R) gerichtet ist und an Protein A (oder G) Agarose immobilisiert wurde, inkubiert und die immunpräzipitierten Peptide anschließend gewaschen und eluiert. Die angereicherten Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen wurden durch Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert und quantifiziert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Zum Entfernen des vorhandenen DMSO wurden die Zellen bei 1300 rpm für 5 min abzentrifugiert und anschließend in DMEM resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt, in der frisches Medium vorgelegt wurde.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Diese wurde wieder komplett abgesaugt und die Zellen inkubierten bis zur Ablösung von der Flasche im Brutschrank. Die Zellen wurden in 3 ml kaltem Einfriermedium (DMEM, 20% FKS, 10% DMSO) resuspendiert und auf zwei vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend bei -80°C gelagert bzw. zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Sofern nicht anders vorgesehen, wurden die adhärennten Zellen mit dem entsprechenden DMEM-Medium (siehe 2.5) im Brutschrank bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 6% CO₂ kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 4-5 Tage. Dabei wurde der Überstand der Zellen abgesaugt, diese zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und 1 bis 2 ml Trypsin/EDTA pro 175 cm² Flasche hinzugefügt. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, bis sie sich ablösten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und in einem definierten Verhältnis auf eine neue Zellkulturflasche mit DMEM-Vollmedium überführt.

3.2.3 Stimulation und Ernten von Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit IL-1 α (f.c. 10ng/ml) oder TNF α (f.c. 20ng/ml) für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten. Dabei wurden die Zytokine direkt zum Vollmedium gegeben.

Erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem CDK4/6 Inhibitor PD332991 (f. c. 10 μ M), TAK-Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol (f. c. 1 μ M) oder p38-MAPK Inhibitor SB203580 (f. c. 2 μ M) wurden diese 30min vor der Zytokinstimulation zum Vollmedium dazugegeben.

Die Zellen wurden zum Ernten zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS abgekratzt und anschließend bei 3000 rpm für 5 min (4°C) pelletiert. Die Zellen wurden direkt lysiert oder bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Für ELISAs wurden Zellkulturüberstände verwendet. Diese wurden in 1,5 ml Gefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.4 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einführen von Fremd-DNA in Zellen. Hierbei unterscheidet man zwischen einer transienten Transfektion, bei der die Plasmid-DNA temporär in die Zelle eingebracht wird und nach dem Passagieren wieder verloren geht, und der stabilen Transfektion. Bei dieser wird das transfizierte Expressionsplasmid in die chromosomale DNA integriert. Die Selektion auf stabile Integration erfolgt über ein Resistenzgen.

3.2.4.1 Transiente Transfektion mit Kalziumphosphat

Bei der Kalziumphosphat-Methode wird die DNA mit einem phosphathaltigen Puffer und Kalziumchlorid gemischt. Dadurch bindet sich die zu übertragende DNA an das ausfallende Kalziumphosphat. Die feinen Kalziumphosphatkristalle kommen mit der Zelle in Kontakt und werden über Endocytose von dieser aufgenommen.

Die folgenden Angaben gelten für ein Well einer 6-Well-Platte.

Am Vortag der Transfektion wurden je nach Zelltyp und Transfektionsdauer pro Well $2-4 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Für jedes Well wurden 225 μ l 2x HEBS, 250 μ l H₂O und die gewünschte Menge DNA gemischt und kurz gevortext. Die Bildung der Präzipitate erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 31,5 μ l einer kalten 2 M CaCl₂-Lösung. Die Suspension wurde erneut kurz gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension langsam und durch vorsichtiges Schwenken des Zellkulturgefäßes auf die Zellen gegeben und diese dann für 4-6 h im Brutschrank inkubiert. Zum Entfernen der Präzipitate wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2ml frischem Medium versehen und für weitere 24-48 h kultiviert. HeLa-Zellen wurden vor dem Waschschrift für 3min mit 1ml Schockmedium (10% Glycerin in DMEM-Medium) behandelt.

3.2.4.2 Transiente Transfektion mit Lipofectamin

MRC5, U251 und G55 wurden nach Herstellerangaben mit *Lipofectamin LTX and PLUS reagents* (Invitrogen) mit folgenden Modifikationentransient transfiziert: Die Zellen wurden in 6-Well-Platten mit 3 μ g Plasmid, 3 μ l PLUS Reagenz und 8 μ l Lipofectamin transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen wurden für 96 h mit 1 μ g/ml Puromycin selektiert.

3.2.5 Herstellung eines stabil transfizierten Zellpools bzw. stabiler monoklonaler Zelllinien

In dieser Arbeit wurden HeLa Tet-On Zellen mit pBI-EGFP, pBI-EGFP-CDK6wt und pBI-EGFP-CDK6-S178P-Konstrukten stabil transfiziert. Unter Verwendung der Kalziumphosphat-Methode wurden pro 6-Well 5 μ g Plasmid mit 1 μ g des Puromycin-kodierten Plasmids pBSPAC Δ P kotransfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und Puromycin (1 μ g/ml) hinzugegeben. Das Medium wurde während der Selektion alle 2-3 Tage gewechselt, um tote Zellen im Überstand zu entfernen. Die Zellen wurde bei 80-90% Konfluenz auf die nächst größere Zellkulturflasche gesplittet. Die stabil transfizierten Zellen wurden ständig unter Puromycin gehalten.

Um eine monoklonale Zelllinie aus den stabil transfizierten Zellen herzustellen, wurden diese mit konditioniertem Medium (50% Vollmedium, 50% filtrierter Zellkulturüberstand) bis auf eine Konzentration von 50 Zellen/ml verdünnt. 22 μ l dieser Zellsuspension wurden nun in jedes Well einer 60-Well-Platte pipettiert, so dass jedes Well im Durchschnitt 1,1 Zellen enthielt. Die Mikrotiter-Platte wurde anschließend im Brutschrank inkubiert. Durch tägliche Inspektion der 60-

Well-Platte wurde das Wachstum der Zellen beobachtet und dokumentiert. Nur Zellen, die in einer Vertiefung aus einer Einzelzelle zu Beginn der Selektion gewachsen sind, wurden bei 80-90% Konfluenz in eine 24-Well-Platte überführt. Dabei wurde das Medium von den Zellen entfernt und zu diesen 22 µl Trypsin/EDTA für 2 min hinzugefügt. Nach vorsichtigem Resuspendieren wurden die Zellen in ein 24-Well überführt, in welchem bereits 500µl konditioniertes Medium vorlagen. Die Zellen wurden bis zum nächsten Passagieren im Brutschrank inkubiert und bei 80-90% Konfluenz auf die nächst größere Zellkulturflasche mit DMEM-Vollmedium gesplittet.

3.2.6 Synchronisierung der Zellen

Um HeLa-Zellen in der frühen G1-Phase des Zellzyklus bzw. in der G0-Phase zu arretieren, wurden diese für 48h ohne FKS im Medium kultiviert. Durch Zugabe von 20%FKS konnten die Zellen wieder in die G1-Phase eintreten. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen stimuliert und/oder geerntet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen

Alle Schritte der Zellyse wurden auf Eis durchgeführt, um eine Degradation zellulärer Proteine zu vermeiden. Je nach Verwendungszweck wurde das Zellmaterial mit unterschiedlichen Lysepuffern und Protokollen behandelt.

3.3.2 Lysate zur Immunodetektion im Westernblot

Hierbei erfolgte die Zellyse im Speziallysepuffer. Das Zellpellet wurde zunächst in einem entsprechenden Volumen an Speziallysepuffer resuspendiert (für ein 6-Well wurden 50 µl verwendet). Die resuspendierten Zellen wurden 15 min inkubiert und anschließend 15 min bei 10600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt.

3.3.2.1 Lysate zur Messung von Reportergenaktivitäten

Die Lyse erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben. Der eingesetzte β -gal-Lysepuffer enthielt jedoch weniger Triton X-100 als der Speziallysepuffer.

3.3.2.2. Lysate für Koimmunopräzipitation

Um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Bohmann/Weiss-Lysepuffer (Weiss et al. 2003) lysiert. Nach einer Inkubation

von 20 min auf Eis wurde die Zellsuspension zum vollständigen Zellaufbruch dreimal für 20 sek sonifiziert. Das Lysat wurde dann für 20 min bei 100000xg (4°C) zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt.

3.3.3 Koimmunopräzipitation

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Hierbei wird mittels eines Antikörpers und Protein A- oder Protein G-Sepharose das jeweilige Antigen aus einem Zelllysat (Bohmann/Weiss-Lyse) isoliert. Bei geeigneten Bedingungen können auch Bindungspartner des Antigens präzipitiert werden und somit die Interaktion von Proteinen nachgewiesen werden.

Zunächst wurden pro Ansatz 15 µl *TrueBlot* Ig IP Beads (anti-Kaninchen oder anti-Maus) durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml Lysepuffer äquilibriert (9000 rpm, 1 min, 4°C). Anschließend wurden die Beads auf ein Volumen von 600 µl mit Lysepuffer aufgefüllt und 1 µg des entsprechenden Antikörpers dazugegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 4°C (rotierend) wurden die immobilisierten Beads abzentrifugiert und das Lysat, welches eine Proteinmenge von 1 mg enthielt, dazugegeben. Der Ansatz wurde auf 1 ml mit Lysepuffer aufgefüllt und erneut 2 h rotierend bei 4°C inkubiert. Das Protein-Antikörper-Beads Gemisch wurde abzentrifugiert (1 min, 9000 rpm, 4°C) und dreimal mit je 1 ml des entsprechenden Puffers gewaschen. Die Elution der immobilisierten Proteine erfolgte durch Aufkochen der Beads in 50 µl 2xRoti-Load für 10 min bei 95°C. Die Eluate wurde mittels SDS-Page untersucht.

Für den Nachweis bzw. die Bindung von GFP-gekoppelten Proteinen wurden GFP-Trap®-Agarose-Beads (ChromoTek) verwendet. Hierfür wurden 5 µl der GFP-Trap®-Agarose-Beads dreimal mit je 1 ml Lysepuffer äquilibriert (5000 rpm, 1 min, 4°C). Der weitere Ablauf der Koimmunopräzipitation mit diesen Beads entspricht dem oben beschriebenen.

3.3.4 Fraktionierte Lyse (Tanaka et al. 2007)

Zur Trennung der zellulären Proteine in cytosolische Fraktion, lösliche und unlösliche (Chromatin) Kernfraktion wurde zunächst das Zellpellet in fraktionierte Lysepuffer I resuspendiert (300 µl für eine 145 cm² Schale) und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 1 min bei 2300xg (4°C) zentrifugiert. Der Überstand enthält die cytosolischen Proteine (C) und wurde in ein frisches 1,5 ml Gefäß überführt. Das Pellet wurde anschließend in fraktionierte Lysepuffer II resuspendiert (Volumen siehe Puffer I) und 20 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Zellsuspension zweimal kurz gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 20400xg (4°C)

wurde der Überstand (Kernfraktion 1, N1) in ein frisches 1,5 ml Gefäß pipettiert. Um die Chromatin-Kernfraktion zu erhalten, wurde das Pellet in fraktionierte Lysepuffer III (Volumen siehe Puffer I) durch kräftiges Vortexen gelöst. Für den kompletten Zellaufschluss wurde die Suspension 10-30 sek sonifiziert (Branson Sonifier, Stufe 2) und anschließend 50 min auf Eis inkubiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (5 min, 20400xg, 4°C) wurde der Überstand überführt. Dieser enthält die unlöslichen Kernproteine (Chromatin-Kernfraktion, N2). Alle Fraktionen wurden direkt nach der Proteinbestimmung aufs Gel aufgetragen oder bei -80°C gelagert.

3.3.5 Reporter-genversuche

Um Rückschlüsse auf die Aktivierung eines Promotors ziehen zu können, wurden Reporter-gene, die unter der Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors stehen, transfiziert. Als Reporter-gen wurde in dieser Arbeit Luziferase gemessen, dessen Promotor zwei Gal4-Bindestellen enthält.

3.3.5.1 Luziferase-Messung

Unter ATP-Verbrauch setzt Luziferase mit Coenzm A den Farbstoff Luziferin um, wodurch es zur Chemilumineszenz kommt. Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte als Doppelwert. Je 20 µl Lysat wurden in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Im 10 sek Abstand wurden 100 µl Luziferase-Reagenz dazugegeben. Die Messung erfolgte ebenfalls im 10 sek Abstand.

3.3.5.2 β -Galaktosidase-Messung

Da die Transfektionseffizienz einen Einfluss auf die Messwerte von Reporter-genversuchen hat, wurde zur Normalisierung der Werte ein zweites, konstitutiv exprimiertes Reporter-gen kotransfiziert. Dazu wurde das Plasmid pSV- β -Gal verwendet. Bei diesem wird ein bakterielles β -Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors exprimiert. Durch die Messung der Chemilumineszenz des umgesetzten Substrates konnte die Galaktosidaseaktivität bestimmt werden.

Zur Inaktivierung der endogenen β -Galaktosidase wurden 15 µl Lysat für 1 h bei 50°C erhitzt. Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte als Doppelwert. Zur Messung wurden 5 µl Lysat in einer 96-Well-Platte vorgelegt und mit 25 µl Reaktionspuffer (Clontech) für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der Chemilumineszenz.

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode, welche auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteine in saurer Lösung beruht. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm (Bradford 1976).

Zur Messung der Proteinkonzentration einer Probe wurde diese zunächst in PBS verdünnt und 100 µl der Verdünnung in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Ebenso wurden 100 µl einer BSA (*bovine serum albumin*)-Standardreihe (0-35 µg/ml in PBS) vorgelegt. Zu den Proben und der Standardreihe wurden nun 100 µl Farbstofflösung, welche eine Mischung aus Farbstoffkonzentrat *Roti Quant* 40% (v/v) und ddH₂O 60% (v/v) ist, dazugegeben. Nach etwa 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm im *Microplate Spectrophotometer*. Die Konzentration der Probe wurde anhand der Standardreihe berechnet.

3.3.7 GST-pulldown-Assay

Eine weitere Methode, um *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen oder eine Koimmunopräzipitation zu bestätigen, ist der GST-pulldown-Assay. Dieser beruht auf der Bindung eines GST-gekoppelten Proteins an Gluthathion-Sepharose-Beads. Nach Zugabe möglicher Interaktionspartner in Form von Zelllysaten binden diese an die Matrix und können anschließend eluiert und analysiert werden. Der Pulldown-Assay ähnelt somit der Immunopräzipitation, wobei das fusionierte Trägerprotein (*tag*) die Funktion des Antikörpers übernimmt.

Zunächst wurden 30 µl GSH-Sepharose-Beads pro Ansatz zweimal mit je 1 ml Lysepuffer äquilibriert (9000 rpm, 1 min, 4°C). Anschließend wurden die Beads auf ein Volumen von 1 ml mit Lysepuffer aufgefüllt und das GST-Fusionsprotein dazugegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 4°C (rotierend) wurden die GST-Fusionsprotein-gekoppelten Beads abzentrifugiert und 1 mg des Lysats dazugegeben und 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurden die Beads dreimal mit Lysepuffer gewaschen und die Elution der immobilisierten Proteine erfolgte durch Aufkochen der Beads in 50 µl 2xRoti-Load (+1 mM DTT) für 10 min bei 95°C. Die Eluate wurden mittels SDS-Page untersucht.

3.3.8 Kinase-Assay

Um die Phosphorylierung von TRIP6 zu untersuchen, wurden *in vitro* Kinase-Versuche durchgeführt.

3.3.8.1 Kinase-Assay mit immunopräzipitierten Proteinen

Nach Lyse der Zellen mit dem Speziallysepuffer wurde eine Immunopräzipitation wie unter 3.3.3 beschrieben durchgeführt. Zum Äquilibrieren der Beads und zum Waschen wurde der Kinase-IP-Puffer verwendet. 1/3 der gewaschenen Beads wurde direkt in 30 µl 1x Roti-Load aufgekocht und im Westernblot auf eine gleichmäßige Immunopräzipitation untersucht. 2/3 der Beads wurden mit dem Kinasereaktionsgemisch versetzt, das aus folgenden Komponenten besteht:

10 µl IP-Puffer

2-10 µg GST-Fusionsprotein ad 10 µl H₂O

10 µl ATP-Mix, bestehend aus: 15 µM ATP + 8 µCi ³²P-ATP ad 10 µl ATP-Puffer

Nach einer Inkubation von 30 min bei 20°C unter konstantem Schütteln im Thermomixer (1200 rpm), wurden die Ansätze mit 10 µl 4x Roti-Load versetzt und 10 min bei 95°C aufgekocht. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die im Überstand befindlichen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde 5-10 min mit einer Coomassielösung gefärbt, über Nacht entfärbt und anschließend getrocknet. Die Phosphorylierung der Proteine wurde durch Autoradiographie detektiert.

Die Kinase-Versuche nach einem GST-pulldown-Assay wurden bis zu den Waschsritten wie unter 3.3.7 beschrieben durchgeführt. Die Beads wurden zweimal mit Speziallysepuffer und einmal mit ATP-Puffer gewaschen. Zu den Beads wurde 30 µl ATP-Mix (15 µM ATP, 8 µCi ³²P-ATP ad 10 µl ATP-Puffer) hinzugefügt und anschließend 20 min bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden wie beschrieben aufgekocht und analysiert.

3.3.8.2 Variante des CDK6 Kinase-Assays nach Matsushime et al. 1994

Um die Phosphorylierung von Rb durch CDK6 zu untersuchen wurden *in vitro* Kinase-Assays unter veränderten Lyse- und IP-Bedingungen durchgeführt, die eine Reduktion der unspezifischen Rb-Phosphorylierung ermöglichten. Die Zelllysen und IPs wurden dabei wie in Matsushime et al. beschrieben durchgeführt (Matsushime et al. 1994). Dafür wurden die Zellen im IP-Puffer (50mM HEPES, pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM EGTA, 0.1% Tween-20, 10% Glycerol, 1mM NaF, 10mM β-glycerophosphat, 0.1mM Na₃VO₄, 1mM DTT, Proteaseinhibitormix, 0,1mM PMSF) für 20 min auf Eis lysiert, zweimal für 10 sek sonifiziert und anschließend für 5 min bei 10000xg und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende Immunpräzipitation wurden 0,25 mg des Lysats in 500 µl

IP-Puffer für 2 h mit 1 µg Antikörper oder IgG-Antikörper an Protein A/G-Sepharose Beads rotierend bei 4°C inkubiert. Die spezifischen Antikörper wurden vorher für 2 h an 30 µl Protein A/G-Sepharose Beads gekoppelt. Nach der Antikörper-Beads-Lysat-Kopplung wurden die Beads viermal mit je 1 ml IP-Puffer und zweimal mit 50 mM HEPES, pH 7,5 (plus 1 mM DTT) gewaschen. Ein Drittel der gewaschenen Beads wurden direkt in 30 µl 1x Roti-Load aufgekocht und im Westernblot auf eine gleichmäßige Immunopräzipitation untersucht. Zwei Drittel der Beads wurden mit dem Kinasereaktionsgemisch versetzt, der aus folgenden Komponenten besteht:

2-10 µg GST-Fusionsprotein

8 µCi ³²P-ATP

20 µM ATP

ad 30 µl Kinase-Puffer (50mM HEPES, pH 7,5, 10mM MgCl₂, 2,5mM EGTA, 10mM β-glycerophosphat, 1mM NaF, 0,1mM Na₃VO₄, 1mM DTT)

Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C unter konstantem Schütteln im Thermomixer (1000 rpm), wurden die Ansätze mit 10 µl 4x Roti-Load versetzt und 10 min bei 95°C aufgekocht. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die im Überstand befindlichen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde 5-10 min mit einer Coomassielösung gefärbt, über Nacht entfärbt und anschließend getrocknet. Die Phosphorylierung der Proteine wurde durch Autoradiographie detektiert.

3.3.9 Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

In dieser Arbeit wurde GST-TRIP6 bakteriell exprimiert und anschließend über GSH-Sepharose aufgereinigt.

3.3.9.1 Induktion der Expression

Die Expression von GST-TRIP6 steht unter der Kontrolle eines tac-Promotors und kann durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactopyranose, ein Galaktose-Derivat) induziert werden. BL21-AI-Bakterien, welche das GST-Fusionsprotein exprimieren, wurden in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden vier Erlenmeyerkolben mit je 500 ml LB-Medium und dem jeweiligen Antibiotikum mit einer OD von ca. 0,1 angeimpft. Die Bakterien wurden solange inkubiert (37°C, 180 rpm), bis diese eine OD von 0,6-0,8 erreicht hatten. Die OD wurde bei 650 nm mit LB-Medium als Referenz gemessen. Es folgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 500 µM

IPTG. Nach weiterer Inkubation bei 37°C und 180 rpm für 4 h wurden die Bakterien für 10 min bei 3600 rpm pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden anschließend in 40 ml PBS (+ 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert, vereinigt und erneut für 10 min bei 3600 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS (+ DTT, PMSF) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.9.2 Aufreinigung

Die Bakterien wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit 0,1% NP40 lysiert. Nach dem Auftauen wurden die Bakterien auf Eis gestellt. Zur vollständigen Lyse wurde die Suspension sechsmal 45 sek sonifiziert (Branson Sonifier 250, Stufe 1). Das Lysat wurde anschließend zum Abtrennen von unlöslichen Zellbestandteilen für 30 min bei 20000 rpm (4°C) abzentrifugiert. Die GSH-Sepharose-Beads wurden viermal mit je 1 ml PBS (+DTT, PMSF) äquilibriert. Für zwei Liter Bakterienkultur benötigt man 1 ml GSH-Beads. Die Beads wurden zusammen mit dem zentrifugierten Überstand in ein 15 ml Gefäß gegeben und bei 4°C 45 min langsam über Kopf rotiert. Vor der Elution wurden die GSH-Beads für 10 min (1800 rpm, 4°C) abzentrifugiert, viermal mit je 1,5 ml PBS (+ DTT, PMSF) gewaschen (9000 rpm, 1min, 4°C) und in zweimal 500 µl aufgeteilt. Es wurden fünfmal je 600 µl Elutionspuffer zu 500 µl Beads gegeben und diese bei Raumtemperatur 10 min bei 750 rpm im Thermomixer geschüttelt, um das Protein von den Beads zu lösen. Die fünf erhaltenen Eluate wurden mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein des GST-Fusionsproteins überprüft. Anschließend wurden die Eluate vereinigt und über Nacht im ausgekochten Dialyseschlauch bei 4°C dialysiert, um das überschüssige Glutathion zu entfernen. Am nächsten Tag wurde das dialysierte Eluat in einer Vivaspin-Säule bis auf ein Volumen von 200-300 µl aufkonzentriert. Zur Langzeitlagerung bei -20°C wurde das Protein mit final 50% Glycerol versetzt.

3.3.10 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennen sich Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung auf. Durch die Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat), welches an die hydrophoben Bereiche eines Proteins bindet, werden die Proteine denaturiert und negative Ladungen in die denaturierten Polypeptidketten eingeführt, so dass diese im elektrischen Feld zur Anode wandern.

In Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 8-12,5%ige Trenngele sowie 5%ige Sammelgele verwendet

Tabelle 13: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

Lösung (ml)	8%iges Trenngel	10%iges Trenngel	12,5%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
ddH ₂ O	5,41	3,65	1,45	5,61
Trenngelpuffer	10,12	10,12	10,12	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1,26
50% (v/v) Glycerol	2,38	2,38	2,38	0,9
2% (w/v) SDS	1,32	1,32	1,32	0,5
30% (w/v) Acrylamid	7,04	8,80	11,00	1,68
40% (w/v) APS	0,040	0,040	0,040	0,03
TEMED	0,027	0,027	0,027	0,02
Gesamt	26,4	26,4	26,4	10

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, welches nach dem Polymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet wurde. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Roti-Load Auftragspuffer versetzt, 10 min bei 95°C denaturiert, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder für einen Westernblot eingesetzt oder *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt, getrocknet und für eine Autoradiographie verwendet.

3.3.11 Westernblot und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im *semi dry*-Verfahren. Das Gel wurde luftblasenfrei auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt und von oben und unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2 mm) eingelegt, welche zuvor in Blotpuffer getränkt wurden. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 0,75mA/cm². Im Anschluss wurde der Transfer der Proteine auf die Membran mit einer 0,1%igen Ponceau S-Lösung überprüft. Nach der Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit TBST vollständig entfärbt.

Für die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur in 5% Magermilch (in TBST) geblockt. Für die Detektion der gewünschten Proteine wurde die Membran im Anschluss über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT mit einer Verdünnung (1:500 bis 1:10000 je nach Antikörper) des Primärantikörpers in 5% Magermilch (in TBST) oder 5% BSA (in TBST) unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal für je 5 min mit TBST gewaschen, um überschüssige nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach folgte eine Inkubation von 1-3 h bei RT mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 bis 1:5000 in 5% Magermilch in TBST). Überschüssige Antikörper wurden erneut durch Waschen mit TBST entfernt. Die Detektion erfolgte anhand der Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz. Die bei dieser Reaktion frei werdende Energie in Form von Licht konnte auf einem Film (Fujifilm) sichtbar gemacht werden.

Für den Einsatz von anderen Antikörpern auf derselben Membran wurde diese kurz in Methanol gewaschen (zur Inaktivierung des noch gebundenen Sekundärantikörpers), in TBST äquilibriert und erneut in 5% Magermilch in TBST inkubiert.

3.3.12 ELISA für IL-8

Die Bestimmung der Konzentration des Chemokins IL-8 (CXCL8) erfolgte mit einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) der Firma R&D Systems exakt nach Herstellerangaben. Zur Messung wurden unterschiedliche Verdünnungen der Zellkulturüberstände in Medium angesetzt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde als Eichkurve eine Standardreihe von humanem IL-8 mit Konzentrationen von 7,5 pg/ml bis 500 pg/ml verwendet.

3.4 Zellbiologische Techniken

3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit Kernfärbung

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine und deren Lokalisation in der Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden 30 µl einer definierten Zelldichte in IBIDI µ-Slides VI ausgesät und nach 1 h im Brutschrank mit 100 µl Medium pro Kammer aufgefüllt. Nach 24 h wurden 100 µl Medium entfernt und die Zellen zweimal innerhalb von 5 min mit 150 µl Hanks-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl 4%igem Paraformaldehyd in Hanks-Puffer für 5 min fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal für 5 min mit 150 µl Hanks-Puffer gespült und dann in 100 µl 10%igem Serum (verdünnt in Hanks-Puffer mit 0,1% Saponin) für 30 min bei RT geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit 100 µl Primärantikörper für 2 h bei RT. Die Antikörper wurde 1:50-1:200 in Hanks-Puffer mit 0,1% Saponin verdünnt. Die Zellen wurden dreimal für 10 min mit 150 µl Hanks/0,1%Saponin-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation mit 100 µl Cy3- oder FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern für weitere 2 h im Dunkeln erfolgte. Die Sekundärantikörper wurden auch in Hanks/0,1%Saponin-Puffer verdünnt (Cy3-gekoppelter Antikörper 1:200; FITC-gekoppelter Antikörper 1:100). Die Zellen wurden anschließend erneut dreimal für 10 min mit 150 µl Hanks-Puffer gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Zellen für 5 min in 100 µl einer 1 µM Hoechst-Lösung (verdünnt in Hanks-Puffer) inkubiert. Hoechst 33342 (Invitrogen) interkaliert zwischen benachbarten Basen der DNA und ermöglicht somit die Färbung der Zellkerne. Die Zellen wurden dann zweimal innerhalb von 5 min mit 150 µl Hanks-Puffer gewaschen

und für die Dauerlagerung mit 50 µl einer 30%igen Glycerollösung (verdünnt in Hanks-Puffer) versetzt.

Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte an einem Leica DM IRE2 Mikroskop. Das Bearbeiten der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der FW4000 und Leica Deblur Software.

3.4.2 Proximity Ligation Assay (PLA)

Der PLA ist ein hoch sensitiver Assay zur Detektion von Proteinen, ihren Modifikationen oder Interaktionen mit anderen Proteinen *in situ*. In dieser Arbeit wurde das Duolink Kit (Olink Bioscience) nach Modifikation der Herstellerangaben verwendet. Dafür wurden 30 µl einer definierten Zelldichte in IBIDI µ-Slides VI ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert, gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in Hanks Puffer für 5 min fixiert. Danach wurden die Zellen mit Hanks Puffer (+0,1% Saponin) für 10min permeabilisiert und für 30 min bei 37°C im Hybridisierungssofen geblockt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (1:150-1:100) erfolgte für 1 h bei 37°C im Hybridisierungssofen. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in Waschpuffer A, wurden die Zellen mit den PLA Sonden (Duolink in situ PLA Sonde anti-Kaninchen PLUS und Duolink in situ PLA Sonde anti-Maus MINUS; verdünnt 1:5) für 1 h bei 37°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal für 5 min in Waschpuffer A gewaschen. Danach erfolgte die Ligation (30 min) und Amplifikation (100 min) mit dem Duolink Detektionsreagenz bei 37°C im Hybridisierungssofen. Als letzter Schritt wurden die Zellen in Waschpuffer B gewaschen und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (Invitrogen) gefärbt. Kontrollen wurden mit nur einem Primärantikörper oder ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte an einem Leica DM IRE2 Mikroskop. Das Bearbeiten der Rohdaten erfolgte mit der FW4000 Software von Leica.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu genregulatorischen Funktionen von CDK6 in einem *gain-of-function*-Modell

Die CDK6-Expression wird nur zellzyklusabhängig durch D-Typ-Cycline reguliert und somit auch aktiviert. Um den regulatorischen Einfluss von CDK6 auf mögliche Zielgene zu untersuchen, ist es notwendig, die Menge an aktivem CDK6 beeinflussen zu können. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten spezifischen Stimulus wurde deshalb in dieser Arbeit ein Modellsystem etabliert, welches die regulierte Expression von konstitutiv aktivem CDK6 in HeLa-Zellen ermöglicht.

4.1.1 Generierung einer Zelllinie mit regulierbarer Expression von konstitutiv aktivem CDK6

Für die Generierung der Zelllinien wurde ein Doxycyclin-abhängiges Expressionssystem verwendet. Das Tet-On-System erlaubt die Expression des gewünschten Gens durch Zugabe des Tetrazyklin-Derivates Doxycyclin (Gossen et al. 1995). Nach der Bindung von Doxycyclin an das Transaktivatorprotein rtTA kann dieses an das Doxycyclin-abhängige Kontrollelement (TRE) binden und die Transkription des Zielgens aktivieren (Abb. 5A).

Für diese Arbeit wurden HeLa-Tet-On-Zellen verwendet, die das Transaktivatorprotein konstitutiv exprimieren. Zunächst wurden verschiedene Expressionsplasmide generiert. Als Ausgangsvektor und als Kontrollvektor wurde pBI-EGFP verwendet. Dieses Konstrukt enthält einen bidirektionalen minimalen CMV-Promotor, der unter der Kontrolle des TRE steht und dadurch die parallele, Doxycyclin-abhängige Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (Abkürzung GFP; *green fluorescent protein*) und eines weiteren Proteins ermöglicht. Über XhoI- und NheI-Schnittstellen wurde sowohl humanes Wildtyp-CDK6 (CDK6 wt) (Abb. 5B) in diesen Vektor kloniert als auch eine vor kurzem in der Literatur beschriebene konstitutiv aktive CDK6-Mutante (CDK6 S178P) (Bockstaele et al. 2009). Die Funktionalität der entsprechenden Konstrukte wurde mittels transienter Transfektion überprüft. Abbildung 5C zeigt, dass die entsprechenden Konstrukte zu einer Doxycyclin-abhängigen Expression von GFP und CDK6 führen. Die Expression des plasmidkodierten CDK6 in HeLa-Tet-On-Zellen liegt dabei jeweils deutlich über der endogenen Expression von CDK6.

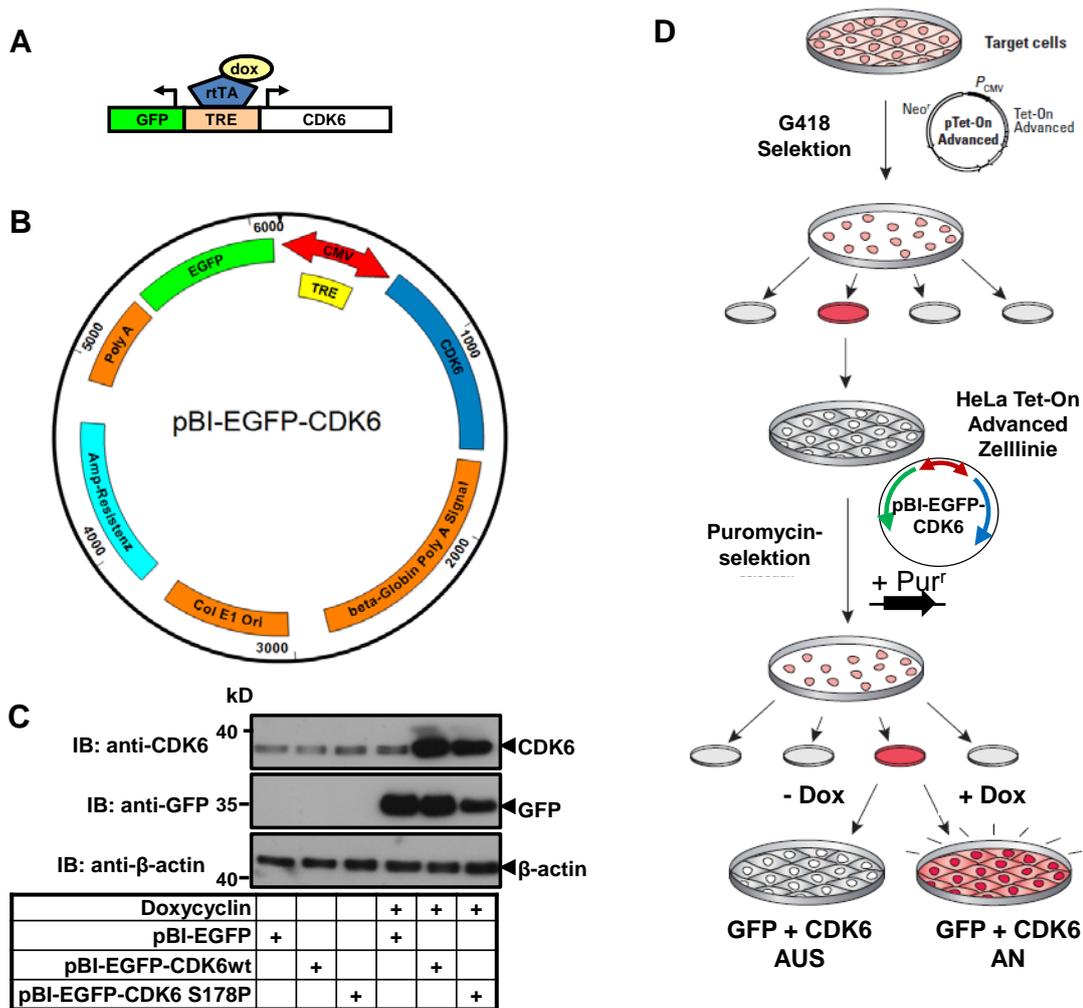


Abbildung 5: Etablierung von Zelllinien, die CDK6 konstitutiv exprimieren. (A) Schematische Darstellung der Doxycyclin-induzierten bidirektionalen Expressionskassette kodierend für *CDK6* und *GFP*. **(B)** Plasmidkarte des generierten pBI-EGFP-CDK6-Vektors. **(C)** HeLa-Tet-On-Zellen wurden transient mit den aufgeführten Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden für 48 h ohne oder mit Doxycyclin (2 µg/ml) inkubiert. Die Menge an CDK6 und GFP in den Zelllysaten wurde im Western Blot nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente β-actin. **(D)** Schematischer Ablauf zur Generierung von stabilen Tet-On-Linien nach transienter Transfektion wie unter A)-C) beschrieben (adaptierte Abb. aus dem Clontech Manuel Tet-On-Linien).

Um den Einfluss von CDK6 auf die inflammatorische Genexpression untersuchen zu können, wurden mit den generierten Konstrukten stabile Linien hergestellt (Abb. 5D).

4.1.2 Einfluss des *CDK6* Wildtyps und der *CDK6* S178P-Mutante auf die Genregulation

Die mit Puromycin selektierten stabilen Tet-On-Linien wurden zunächst anhand der CDK6 mRNA- und Proteinexpression charakterisiert. Wie in Abbildung 6A zu sehen ist, zeigten sowohl die Kontrolllinie pBI-EGFP als auch pBI-EGFP-CDK6wt und pBI-EGFP-CDK6 S178P nach Doxycyclinbehandlung eine Expression von GFP. Die Überexpression von CDK6 auf Protein und mRNA-

Ebene ist nur in den Ansätzen mit CDK6wt oder CDK6 S178P nach Zugabe von Doxycyclin zu verzeichnen (Abb. 6A, B). In den Ansätzen ohne Doxycyclin ist keine erhöhte Transkription / Translation von *CDK6* zu sehen, was die Zuverlässigkeit des Tet-On-Systems zeigt. Eine IL-1-Behandlung, die für die nachfolgenden Analysen wichtig war, hat ebenfalls keinen Einfluss auf die induzierbare *CDK6*-Expression.

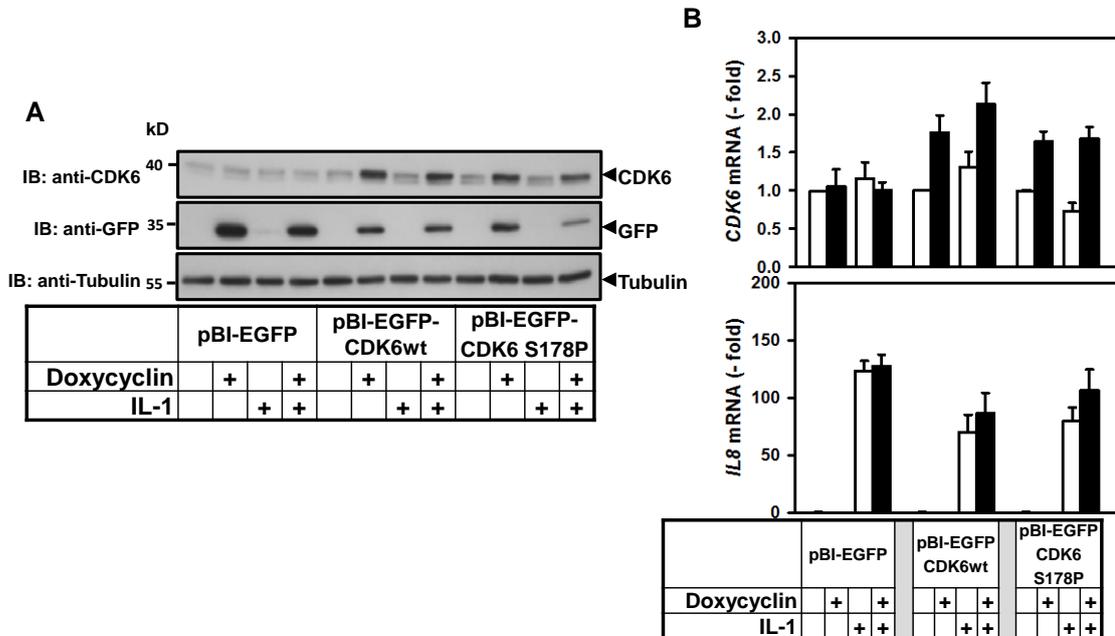


Abbildung 6: Charakterisierung von CDK6 exprimierenden stabilen HeLa Tet-On Linien. (A) HeLa Tet-On Zellen wurden mit den aufgeführten Konstrukten stabil transfiziert. Die *CDK6*- und *GFP*-Expression wurde durch Doxycyclin (2 µg/ml) für 48 h induziert. Im Anschluss wurden die Zellen wie angegeben für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt. Der Proteingehalt an *CDK6*, *GFP* und *Tubulin* wurde im Western Blot analysiert. (B) Die mRNA-Expression von *CDK6* und *IL8* wurde mittels RT-qPCR analysiert. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von vier unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle.

Die generierten Linien wiesen nur in einem Teil der Zellen eine Überexpression von *CDK6* auf (IF-Daten nicht gezeigt), was eine Erklärung für einen fehlenden Doxycyclin-abhängigen Effekt auf die IL-1-induzierte Expression des NF-κB Zielgenes *IL8* (Abb. 6B) bot. Da in den generierten Zellpools nur etwa die Hälfte der Zellen die gewünschte Expression aufwiesen, wurde die Zellpopulation auf 50 Zellen/ml verdünnt, erneut selektiert und kultiviert, um einen stärker selektierten Zellpool zu erhalten. Die daraus entstandenen Linien ergab keinen höher angereicherten Zellpool für *CDK6*wt (Daten nicht gezeigt). Aus der erneuten Selektion der Zellen, die mit *CDK6* S178P transfiziert wurden, konnte dagegen die Zelllinie HeLa Tet-On *CDK6* S178P K5 generiert werden, welche mit 80% einen erhöhten Anteil an Zellen aufwies, die die Zielgene exprimierten (Abb. 7B). Die erhöhte Expression von *CDK6* und *GFP* wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb. 7A). Insgesamt zeigten noch sieben weitere getestete Klone einen ähnlichen Phänotyp (Daten nicht gezeigt).

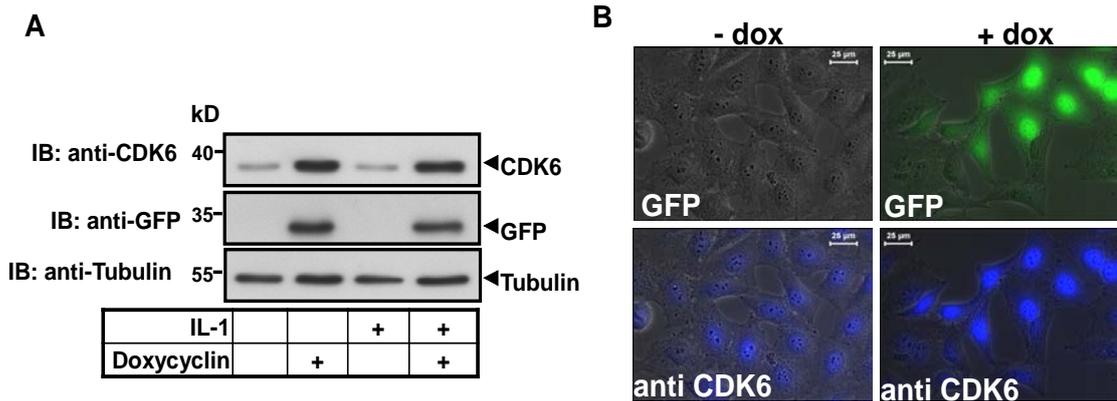


Abbildung 7: CDK6- und GFP-Expression von HeLa Tet-On CDK6 S178P K5 Zellen. (A) Die Zellen wurden für 48 h in An- oder Abwesenheit von IL-1 (10 ng/ml) und/oder Doxycyclin (2 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Expression der Proteine durch Untersuchung der Zellysate im Western Blot analysiert. **(B)** Immunfluoreszenzanalyse der Expression von CDK6 und GFP vor und nach 48 h Inkubation mit Doxycyclin (2 µg/ml). Balken: 25 µm. (modifiziert nach Handschick et al. 2014)

In Abbildung 8A ist zu erkennen, dass die IL-1-induzierte *IL8* und *IL6* mRNA-Expression in induzierten HeLa Tet-On CDK6 S178P K5 Zellen verstärkt ist. Der Effekt von IL-1 auf die mRNA-Expression von *IL8* und *IL6* wurde durch den spezifischen CDK4/6 Inhibitor PD332991 komplett aufgehoben. Mittels ELISA konnte festgestellt werden, dass in HeLa Tet-On CDK6 S178P K5 Zellen die Sekretion von IL-1 induziertem IL-8 leicht, aber statistisch signifikant, erhöht ist (Abb.8B).

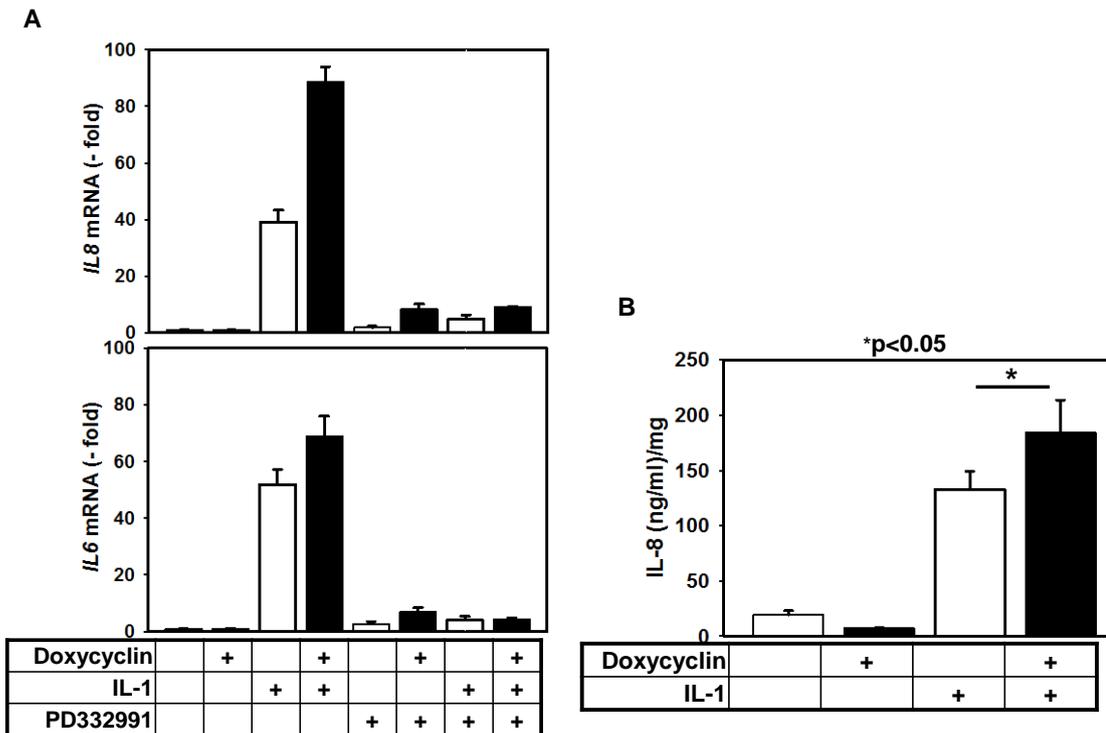


Abbildung 8: Einfluss der CDK6-Expression auf die IL-1-induziertes *IL8* und *IL6* Genexpression in HeLa Tet-On CDK6 S178P K5 Zellen. (A) Die Zellen wurden für 48 h mit oder ohne Doxycyclin (2 µg/ml) inkubiert, mit/ohne PD332991 (10 µM) für 30 min vorbehandelt und anschließend mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) für 1 h inkubiert. Die mRNA-Expression von *IL8* und *IL6* wurde mittels RT-qPCR analysiert. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle (modifiziert nach Handschick et al. 2014) **(B)** Die Zellen wurden für 48 h mit oder ohne Doxycyclin (2 µg/ml) inkubiert und für weitere 24 h mit IL-1 stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden für einen IL-8 ELISA verwendet. Dargestellt ist die sezernierte IL-8 Menge +/- s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle.

4.1.3 Untersuchung der IL-1-induzierten *IL8*-Expression in HeLa Tet-On CDK6 S178P K5 Zellen auf Einzelzellebene

Da es sich bei der HeLa Tet-On CDK6 S178P K5 Linie immer noch um einen, wenn auch deutlich angereicherten, Zellpool handelte, wurde für eine genauere Analyse der Effekte von überexprimiertem *CDK6* die Laser-Mikrodissektion (LMD) genutzt. Bei diesem mikroskopischen Verfahren wurde eine definierte Anzahl an GFP-positiven und somit höchstwahrscheinlich auch aktiv *CDK6* exprimierenden Zellen mit einem Laser ausgeschnitten (siehe Methoden 3.1.14) und die mRNA-Expression im Vergleich zu nicht-doxycyclin behandelten Zellen untersucht. Mittels LMD war es auch möglich, einen eventuell parakrinen Effekt von *CDK6* auf die benachbarten GFP-negativen Zellen zu untersuchen.

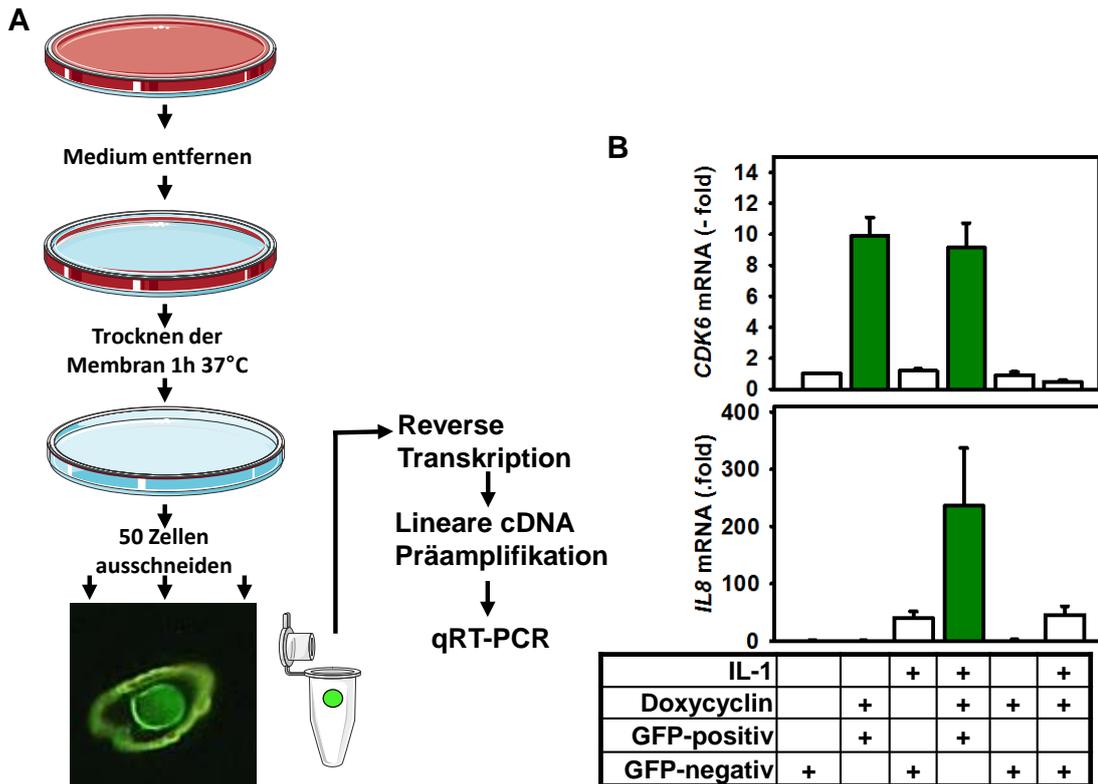


Abbildung 9: Genexpressionsanalyse auf Einzelzellebene mittels LMD. (A) Schematische Darstellung des Prinzips der Laser-Mikrodissektion. (B) Je 50 GFP-positive und GFP-negative Zellen aus Kulturen mit oder ohne Doxycyclin und/oder IL-1 wurden mittels LMD ausgeschnitten. Die mRNA-Expression von *CDK6* und *IL8* wurde mittels RT-qPCR analysiert. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von vier unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle (modifiziert nach Handschick et al. 2014).

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, kann bei den ausgewählten GFP-positiven Zellen eine zehnfach erhöhte Expression von *CDK6* in Doxycyclin-induzierten Zellen festgestellt werden. Die *CDK6*-Expression ist IL-1-unabhängig. Die Überexpression von *CDK6* hat nur bei gleichzeitiger IL-1-Stimulation einen Effekt auf die *IL8* mRNA-Expression. Sowohl aktives *CDK6* als auch eine verstärkte Expression von *IL8* haben keinen Einfluss auf benachbarte Zellen. Diese Daten zeigen, dass aktives *CDK6* die IL-1-induzierten Effekte auf *IL8* und *IL6* spezifisch in genau den Zellen erhöht, die das exogene *CDK6*-Gen überexprimieren (siehe schematische Abb. 10). Zusätzlich ist dieser zellautonome Effekt in einer nicht synchronisierten Tumorzellpopulation messbar und zeigt damit, dass ein *CDK6*-Signal mit den IL-1-Signalwegen in derselben Zelle kooperieren kann.

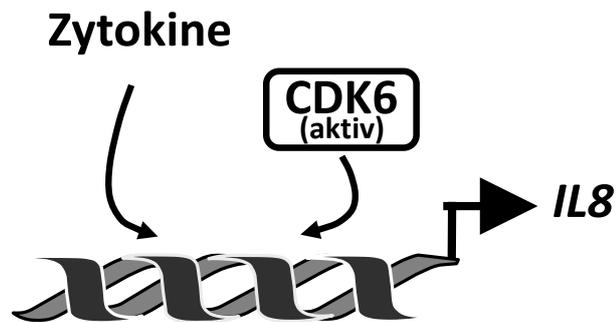


Abbildung 10: Aktiviertes CDK6 fördert die zytokin-induzierte inflammatorische Genexpression. Im *gain-of-function*-Modell konnte gezeigt werden, dass die aktive CDK6-Mutante S178P eine verstärkte IL-1-induzierte inflammatorische *IL8*-Expression in nicht-synchronisierten Zellen bewirkt.

4.2 Aktivierung von CDK6 und zellzyklusabhängige Expression inflammatorischer Gene

Um die Frage zu klären, unter welchen Bedingungen die enzymatische Aktivität des endogenen CDK6 aktiviert wird, wurden IP:*in vitro* Kinaseassays durchgeführt. Hierbei wurden zunächst überexprimierte *CDK6*-Varianten untersucht, zum einen, um die Assays zu etablieren und zum anderen, um die Effekte von *CDK6*-Mutationen auf die katalytische Aktivität direkt zu erfassen.

4.2.1 Generierung einer inaktiven *CDK6*-Variante und Etablierung eines *in vitro* Kinaseassays

Um die Aktivität der *CDK6* S178P-Mutante nachweisen zu können, wurde ein *in vitro* Kinaseassay nach Matsushima et al. (1994) entwickelt. Für den Assay wurde ein rekombinantes Protein verwendet (GST-Rb⁷⁷³⁻⁹²⁸), das einen N-terminalen GST-Tag besitzt, der an den C-terminalen Bereich des Rb-Proteins fusioniert ist, welcher mehrere durch *CDK6* phosphorylierbare Aminosäuren enthält und somit als *in vitro* Substrat für *CDK6* diente (Burke et al. 2010). Als Kontrolle dienten eine phosphorylierungsinactive *CDK6*-Mutante (*CDK6* T177A) (Kaldis et al. 2001) und eine katalytisch inactive *CDK6*-Mutante (*CDK6* K43R). Nach einer Immunpräzipitation von überexprimiertem *CDK6* ist im *in vitro* Kinaseassay eine Phosphorylierung des *CDK6* Substrates GST-Rb⁷⁷³⁻⁹²⁸ erkennbar. Die Aktivität von *CDK6* ist unabhängig von IL-1 (Abb. 11A). Die Kinaseaktivität von *CDK6* S178P erhöht sich stark, wenn zusätzlich Cyclin D3 überexprimiert wird, welches im Komplex mit *CDK6* immunpräzipitiert werden kann (Abb. 11A). Die IgG-Kontrollen zeigen keine Phosphorylierung von GST-Rb⁷⁷³⁻⁹²⁸. Im Gegensatz zu der aktiven *CDK6* S178P-Mutante können beide inaktiven Mutanten (T177A und K43R) zwar immunpräzipitiert werden, zeigen aber im *in vitro* Kinaseassay keine Phosphorylierungsaktivität (Abb. 11B).

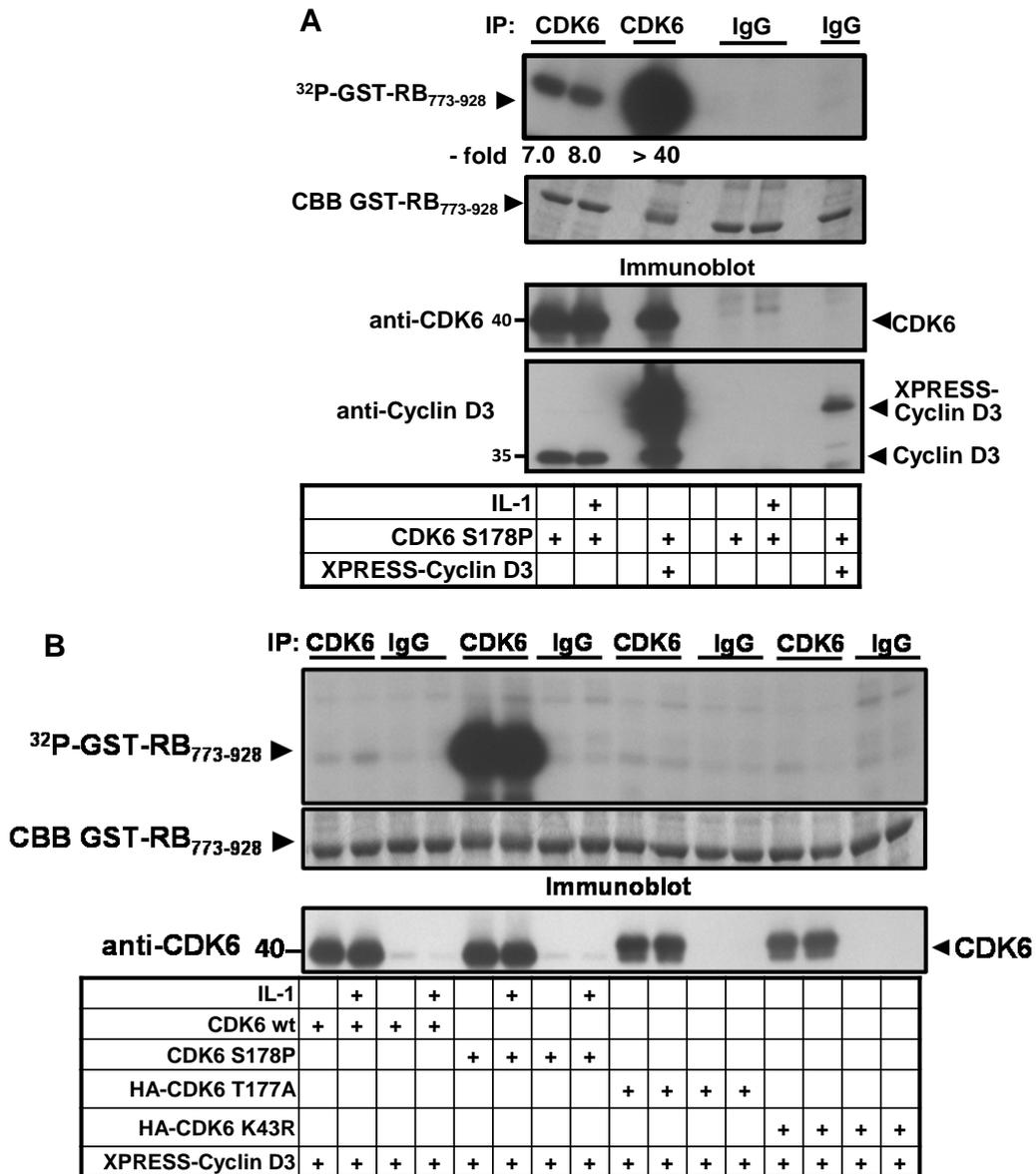


Abbildung 11: *In vitro* Kinaseaktivität überexprimierter CDK6-Varianten. (A) HeLa-Zellen wurden mit pCDNA.3-CDK6 S178P und/oder Cyclin D3 transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) inkubiert. CDK6 wurde aus den Zelllysaten immunpräzipitiert und dessen Aktivität durch die Phosphorylierung von GST-Rb₇₇₃₋₉₂₈ mittels *in vitro* Kinaseassay durch Verwendung von ³²P-ATP nachgewiesen (oben). Parallel dazu wurden Aliquots des Immunkomplexes im Western Blot getestet (unten). Die Zahlen entsprechen der CDK6-Kinaseaktivität relativ zu den Werten unbehandelter Zellen (Abb. 12C). IgG IPs wurden als Negativkontrolle verwendet. (B) HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Vektoren transient transfiziert. Die Zellen wurden wie unter (A) beschrieben behandelt und gleiche Mengen an Zelllysaten wurden für eine CDK6-Immunpräzipitation mit anschließendem *in vitro* Kinaseassay verwendet (oben). Immunpräzipitiertes CDK6 wurde im Western Blot nachgewiesen (unten). IgG IPs wurden als Negativkontrolle verwendet. CBB: Coomassie Brilliant Blue (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

4.2.2 Aktivierung und Expression von CDK6 in Abhängigkeit von Zellzyklus und IL-1-Stimulation

Um die endogene CDK6-Kinaseaktivität zu untersuchen, wurden stabile HeLa-pSuperPuro-Zellen, welche in den Folgeexperimenten immer als Kontrolle verwendet wurden, durch zweitägigen Serumentzug (siehe 3.2.6) in der G0-

Phase synchronisiert (arrest) und durch FKS-Zugabe in den Zellzyklus entlassen (G1 release), wodurch sich ein Teil der Zellen während der Messung in der G1-Phase befindet (Abb. 12A). Die Synchronisation der Zellen in G1 und anschließender Entlassung in die S-Phase durch einen Thymidin-Aphidicolin-Block zeigt, dass deutlich mehr Zellen nach S release sich in der S-Phase befinden, als in G1 nach G1 release (Abb. 12A). Um die CDK6-Kinaseaktivität in Abhängigkeit von IL-1 zwischen synchronisierten (G1-Phase) und nicht synchronisierten Zellen zu vergleichen, wurden wie in Abbildung 12B und C dargestellt, Kinaseassays nach Immunpräzipitation von CDK6 durchgeführt. Die G1 release Zellen zeigen im Vergleich zu arretierten Zellen eine deutlich stärkere Bildung des CDK6-Cyclin D3-Komplexes, was mit einer Verdoppelung der *in vitro* Kinaseaktivität des CDK6:Cyclin D3 Immunkomplexes einhergeht (Abb. 12B). Dieser relativ schwache Anstieg kann damit erklärt werden, dass nur ein Teil der Zellen nach der sechsständigen Serumzugabe wieder in den Zellyzyklus eingetreten ist (siehe FACS-Profil, Abb. 12A). Nicht-synchronisierte Zellen zeigen dagegen keine *in vitro* messbare Regulation der CDK6-Aktivität (Abb. 12C). Weder unter diesen Bedingungen (Abb. 12B, C) noch nach Überexpression (Abb. 11A) ist die CDK6-Kinaseaktivität durch IL-1 regulierbar. In Übereinstimmung mit der Literatur (Kaldis et al. 1998, Bockstaele et al. 2009) erfolgt die Regulation der CDK6-Kinaseaktivität daher offenbar durch eine G1-vermittelte Expression von Cyclin D3, welches an CDK6 bindet und dieses aktiviert.

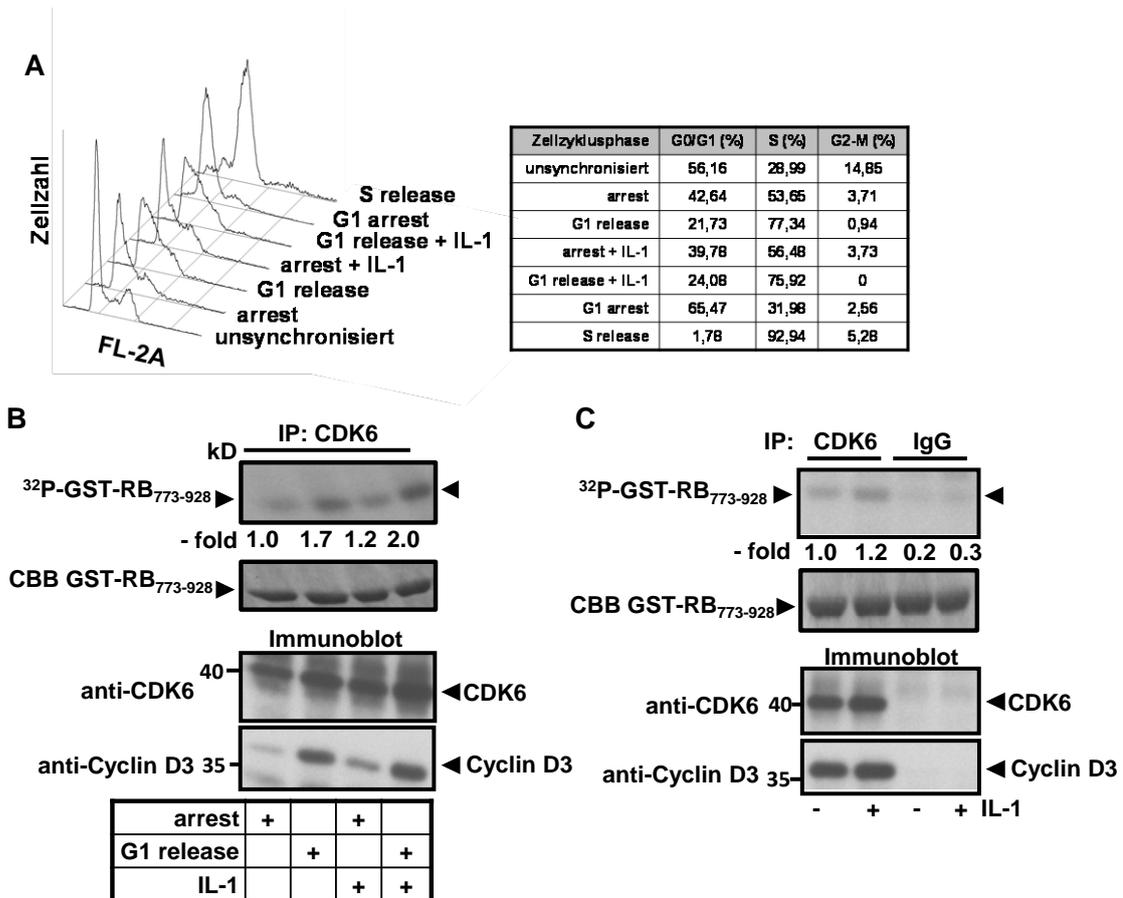


Abbildung 12: Analyse der endogenen CDK6-Kinaseaktivität in synchronisierten und nicht-synchronisierten Zellen. (A) Stabil mit pSuper-Puro transfizierte HeLa-Zellen blieben unbehandelt oder wurden für 48 h in der G0/G1 Phase durch Serumentzug (arrest) oder in der späten G1-Phase durch Thymidin/Aphidicolin-Behandlung (G1 arrest) arretiert. Danach wurden die Zellen für 6 h durch Zugabe von 20 % FKS (G1 release) oder durch Entfernen von Thymidin/Aphidicolin (S release) in den Zellzyklus entlassen. Zusätzlich wurden die Zellen für 30 min mit IL-1 behandelt. Der DNA-Gehalt wurde durch Propidiumiodid FACS-Färbung bestimmt (siehe 3.1.16). Der prozentuale Anteil von Zellen in G0/G1, S-Phase und G2/Mitose ist in der Tabelle aufgelistet. (B) Stabil mit pSuper-Puro transfizierte HeLa-Zellen wurden wie unter (A) arretiert, in G1 entlassen und stimuliert. Die enzymatische Aktivität wurde durch *in vitro* Kinaseassay wie in Abb. 11 beschrieben nachgewiesen. Aliquots des Immunkomplexes wurden im Western Blot analysiert. (C) Der *in vitro* Kinaseassay wurde wie unter (B) beschrieben und mit Zellextrakten von unsynchronisierten unbehandelten oder für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimulierten HeLa-Zellen durchgeführt. IgG IPs wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Zahlen zeigen die CDK6-Kinaseaktivität relativ zu den Werten arretierter Zellen (A) oder unbehandelter unsynchronisierter Zellen (B). CBB: Coomassie Brilliant Blue (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

4.2.3 Inflammatorische Genexpression in synchronisierten Zellen

Unter den Bedingungen, die zu einer Aktivitätserhöhung des endogenen CDK6 führten, wurden anschließend umfangreiche Genexpressionsanalysen durchgeführt. Für die Untersuchung eines möglichen direkten Einflusses des Zellzyklus auf die IL-1-regulierte inflammatorische Genexpression wurden Microarrays in Zusammenarbeit mit Dr. O. Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, MHH) mit synchronisierten Zellen durchgeführt (Abb. 13). In vier unabhängigen Serien an Experimenten, wurden HeLa-Zellen durch 48 h Serumentzug in der G0/frühen G1-Phase arretiert und anschließend mit

oder ohne FKS für 6 h inkubiert (G1 release). Die Zellen blieben anschließend entweder unbehandelt oder wurden für 30 min mit IL-1 inkubiert, um inflammatorische Signalwege zu aktivieren. Die Filterkriterien der durchgeführten Microarrays sind im Methodenteil unter 3.1.15 beschrieben.

Die G1 release Zellen zeigten eine erhöhte Expression von 448 Genen ohne und von 532 Genen mit zusätzlicher IL-1-Behandlung (Abb. 13A), wobei die Mehrheit (400) der aktivierten Gene bei beiden Ansätzen übereinstimmte (Abb. 13B). Insgesamt wurden 132 Gene ausschließlich bei G1 release Zellen mit zusätzlicher IL-1-Stimulation verstärkt exprimiert (Abb. 13B). Neben der Aktivierung von Genen bewirkte der G1 release, sowohl mit als auch ohne IL-1-Stimulation, zusätzlich die Herunterregulierung von mehr als 300 Genen.

Eine IL-1-Stimulation in arretierten Zellen induzierte die Expression von 29 Genen und hemmte nur ein Gen (Abb. 13A). Von den 29 Genen wurden 11 Gene ebenfalls bei G1 release Zellen ohne IL-1-Stimulus aktiviert. Diese 11 Gene sind somit durch den Zellzykluseintritt unabhängig von IL-1 regulierbar (Abb. 13C). Die Gruppe von IL-1- plus G1 release regulierten Genen überlappt mit 28 Genen (Abb. 13D), von denen ein großer Teil einer Reihe von prototypischen inflammatorischen Genen entspricht, die als transkriptionelle Regulatoren fungieren oder Zytokine sind (z.B. *FOS*, *JUN*, *IL8*, *IL6*, *CCL20*, *CXCL1,2,3*). Alle gefilterten Gene sind in Handschick et al. 2014 in der *Supplemental Table S1* aufgelistet.

Abbildung 13E zeigt die Validierung der Microarrays anhand der ausgewählten Gene. Die Gene *IL8*, *IL6*, *CXCL3* und *CCL20* werden durch IL-1, den Zellzyklus-release oder durch beide Bedingungen induziert. Auffallend war, dass bei *IL8*, *IL6* und *CCL20* eine Kostimulation durch G1 release und IL-1 die mRNA Expression synergistisch verstärkte. *I κ B α* (*NFKBIA*) wird nur durch IL-1 induziert, während *CDK6* und *Cyclin D1* (*CCND1*) zellzyklusabhängig reguliert werden. Die Synchronisation der Zellen schien keinen Einfluss auf die Expression von *CDK4* zu haben.

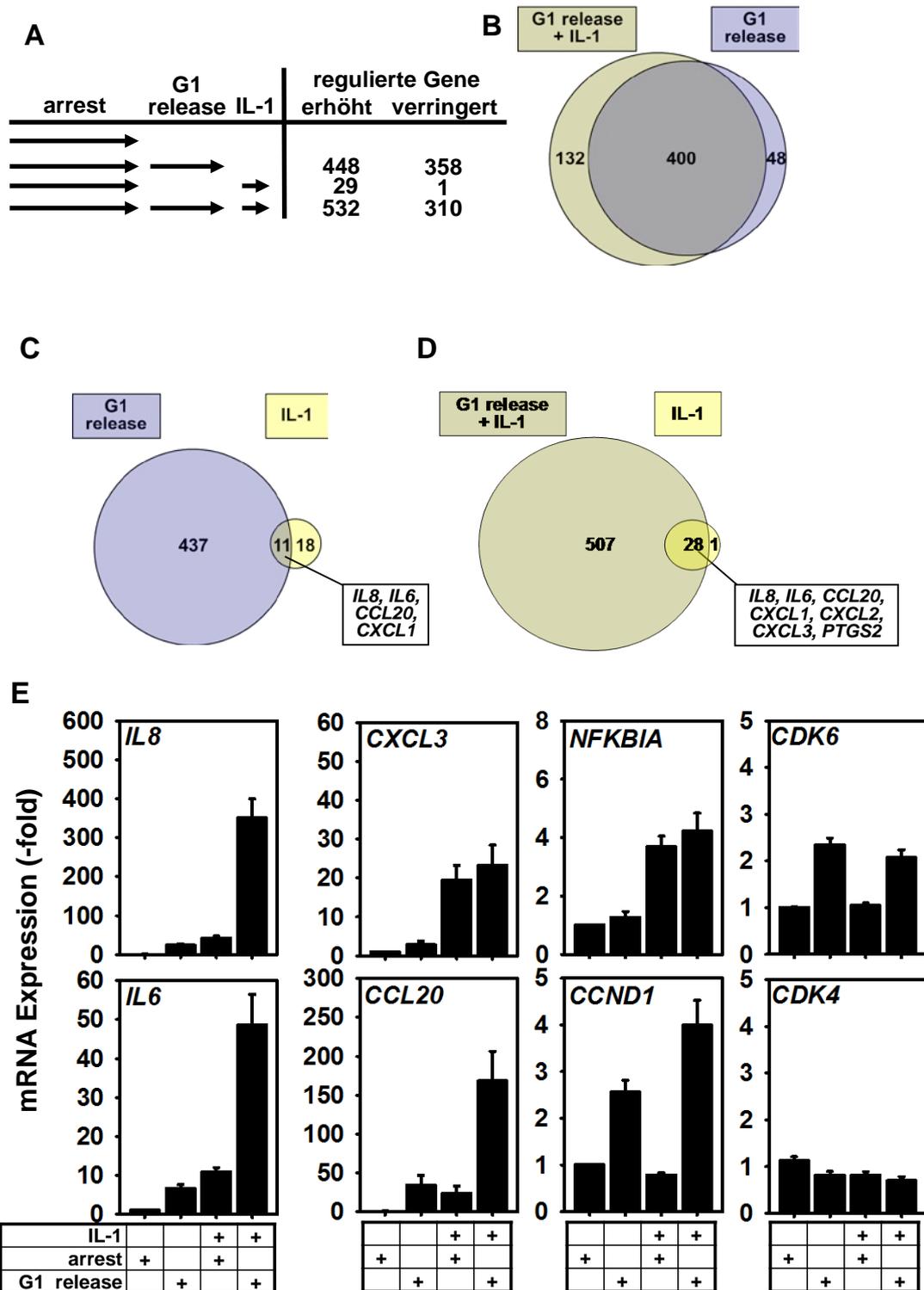


Abbildung 13: Kooperation von IL-1- und G1-regulierten Signalen bei der Genregulation in synchronisierten Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden in der G0/G1 Phase durch Serumentzug für 48 h arretiert (arrest). Danach wurden die Zellen für 6h durch Zugabe von 20% FKS in den Zellzyklus entlassen (G1 release). Zusätzlich wurden arretierte und G1 release Zellen für 30 min mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Isolierte RNA von vier unabhängigen Experimenten wurden für Microarray-Analysen mit dem *Agilent Whole Genome Oligo Microarrays* Kit genutzt. **B-D)** Venn-Diagramme zur Visualisierung der differentiell regulierten Gengruppen wie unter (A) beschrieben. **(E)** Analyse der Expression einzelner inflammatorischer Gene mittels RT-qPCR aus Zellen wie in (A) beschrieben. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von vier unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

In Abbildung 14 ist ein schematischer Überblick über die gewonnenen Erkenntnisse aus dem synchronisierten Zellmodell dargestellt.

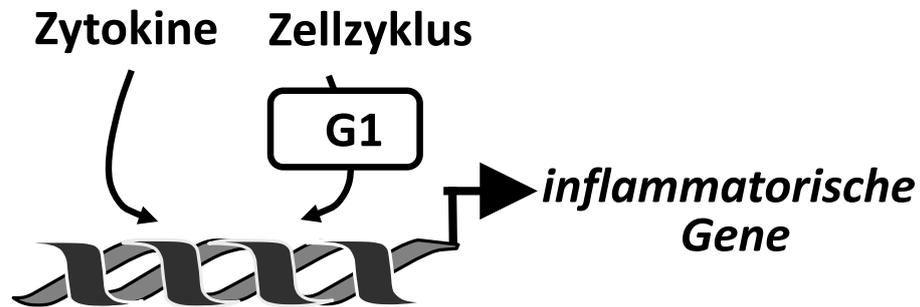


Abbildung 14: Zellzyklusabhängige Signale regulieren die Expression inflammatorischer Gene. Die Analyse synchronisierter HeLa-Zellen zeigte eindeutig eine zellzyklusabhängige Expression inflammatorischer Gene, welche synergistisch die Wirkung des Zytokinstimulus IL-1 verstärken.

4.3 Genomweite Untersuchungen zu genregulatorischen Funktionen von CDK6 in einem *loss-of-function* Modell

Aufgrund der unter 4.1-4.2 dargestellten Ergebnisse zur CDK6-abhängigen Regulation inflammatorischer Gene im *gain-of-function*-Modell, sowie zur zellzyklusabhängigen Aktivierung von CDK6 und inflammatorischen Genen, stellte sich die Frage, ob die zellzyklusabhängige Expression inflammatorischer Gene von CDK6 beeinflusst wird. In einem *loss-of-function*-Modell wurden deshalb die genregulatorischen Funktionen des zellzyklusabhängigen endogenen CDK6 näher untersucht.

4.3.1 Etablierung und funktionelle Charakterisierung einer monoklonalen CDK6-Knockdown-Linie

Durch Vorarbeiten von Helmut Müller, AG Kracht, existierte bereits ein Zellpool stabil transfizierter HeLa-Zellen, die eine spezifische gegen *CDK6* gerichtete shRNA exprimieren und eine aus diesem Zellpool generierte monoklonale Linie (HeLa-pS-shCDK6-K06). Diese Linie wurde hinsichtlich der Expression der in Abb. 13 gezeigten Gene untersucht und mit einer Kontrolllinie ohne spezifischen Knockdown verglichen. Zusätzlich wurde die Expression der Cycline D1 und D3 untersucht, wodurch der Übertritt von G0 in G1 validiert werden konnte. Der *CDK6*-Knockdown hatte keinerlei Einfluss auf die Expression von *CDK4*, Cyclin D1 und Cyclin D3 (Abb. 15A, C). Die mRNA-Expression der IL-1-induzierten Gene *IL6*, *IL8*, *CXCL3* und *CCL20* war nach einem *CDK6*-Knockdown allerdings deutlich geringer. Ein Einfluss von *CDK6* auf *IκBα* war nicht zu erkennen (Abb. 15B, C).

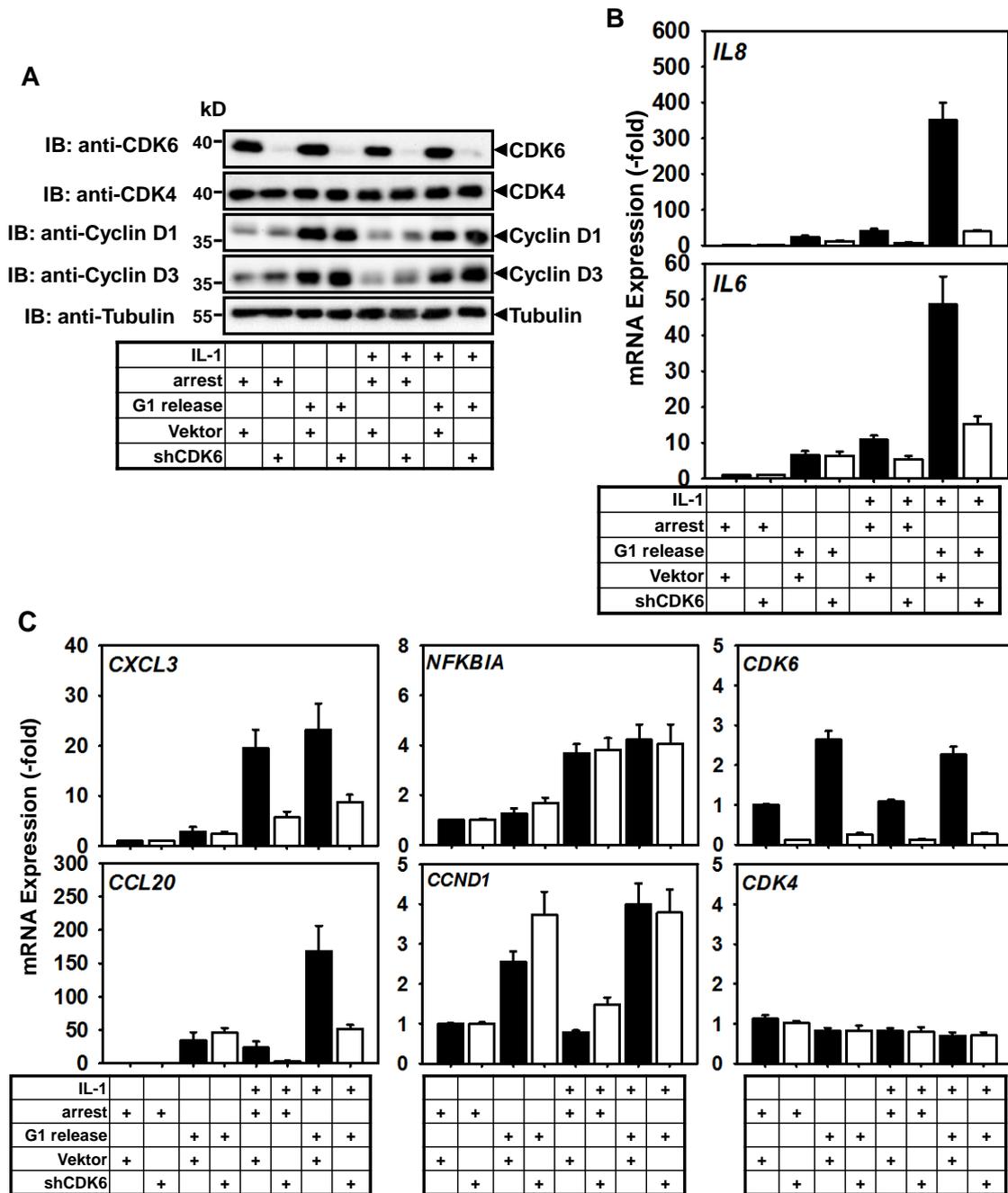


Abbildung 15: CDK6-abhängige Genexpression in synchronisierten Zellen. (A) Stabil transfizierte pSuper.Puro (Vektor) HeLa Kontrollzellen und HeLa-pS-shCDK6-K06-Zellen (shCDK6) wurden wie in Abb. 13A synchronisiert und behandelt. Zelllysate wurden im Western Blot analysiert. Tubulin wurde als Beladungskontrolle verwendet. (B-C) Die Veränderung der inflammatorischen Genexpression der beiden Zelllinien wurde durch RT-qPCR analysiert. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von vier unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014).

Zusätzlich wurde die IL-1-induzierte Expression der inflammatorischen Gene in unsynchronisierten stabilen *CDK6*-Knockdown Zellen untersucht, um stressbedingte Effekte des Synchronisationsprotokolls ausschließen zu können (Abb. 16). Die Experimente bestätigten die Ergebnisse aus Abbildung 15, mit Ausnahme einer Hemmung der IL-1-induzierten *IkB α* -Expression.

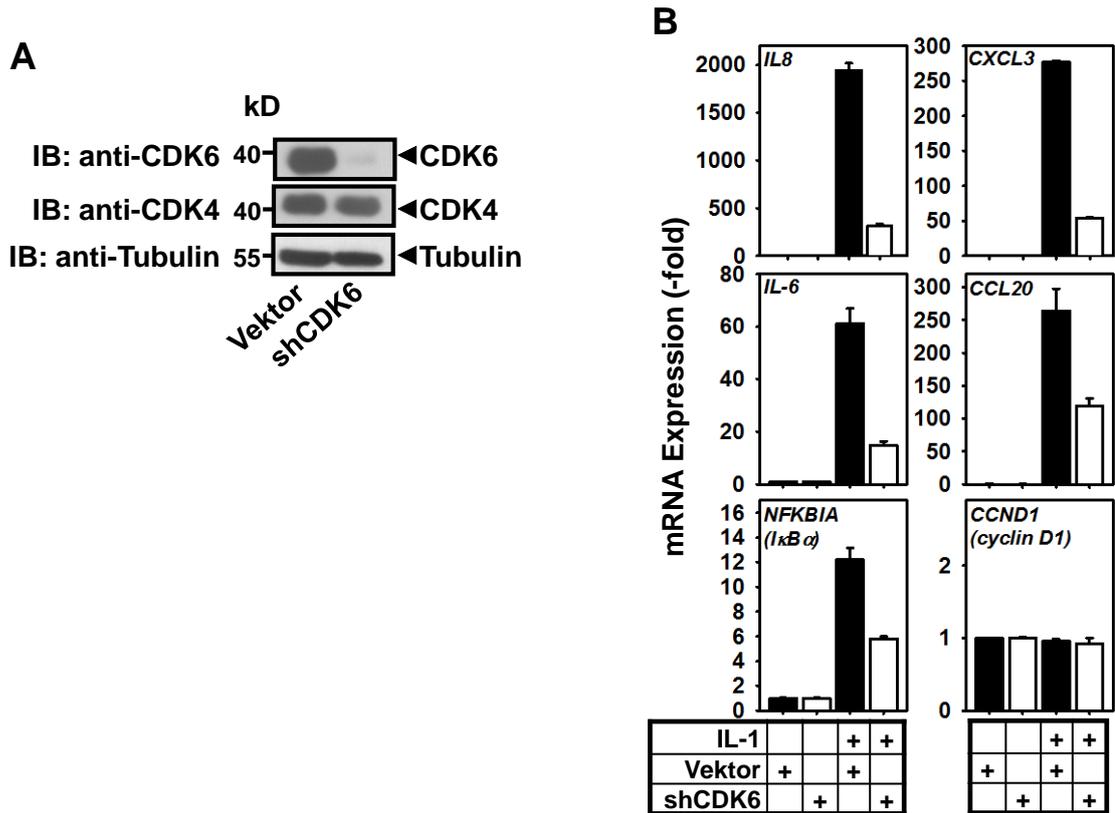


Abbildung 16: CDK6-abhängige Genexpression in unsynchronisierten Zellen. (A) Zellextrakte unsynchronisierter Kontrollzellen (Vektor) und monoklonaler HeLa-pS-shCDK6-K06-Knockdown-Zellen (shCDK6) wurden mittels Western Blot analysiert. Tubulin wurde als Beladungskontrolle verwendet. (B) Zellen wurden wie in (A) für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Die Expression der Gene wurde mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014).

4.3.2 Zellzyklusspezifische Genregulation durch *CDK4*-Knockdown

Da CDK6 und CDK4 eine hohe Homologie aufweisen (71% Identität auf Aminosäureebene) und ähnliche Funktionen in der Regulation des Zellzyklus ausüben, stellte sich die Frage nach dem Einfluss von CDK4 auf die zellzyklusspezifische Genregulation. Nach der Generierung einer monoklonalen HeLa-Zelllinie mit shRNA-vermitteltem *CDK4*-Knockdown durch Helmut Müller, AG Kracht, wurde diese Linie ebenfalls charakterisiert und mit der Kontrolllinie verglichen. In synchronisierten Zellen zeigte CDK4 dabei grundsätzlich denselben Einfluss auf die entsprechenden Gene wie CDK6 und hatte keinen Einfluss auf die *CDK6*-Expression (Abb. 17). Der einzige Unterschied lag in einer leichten Hemmung der *Cyclin D1*- und *IkB α* -Expression (Abb.17).

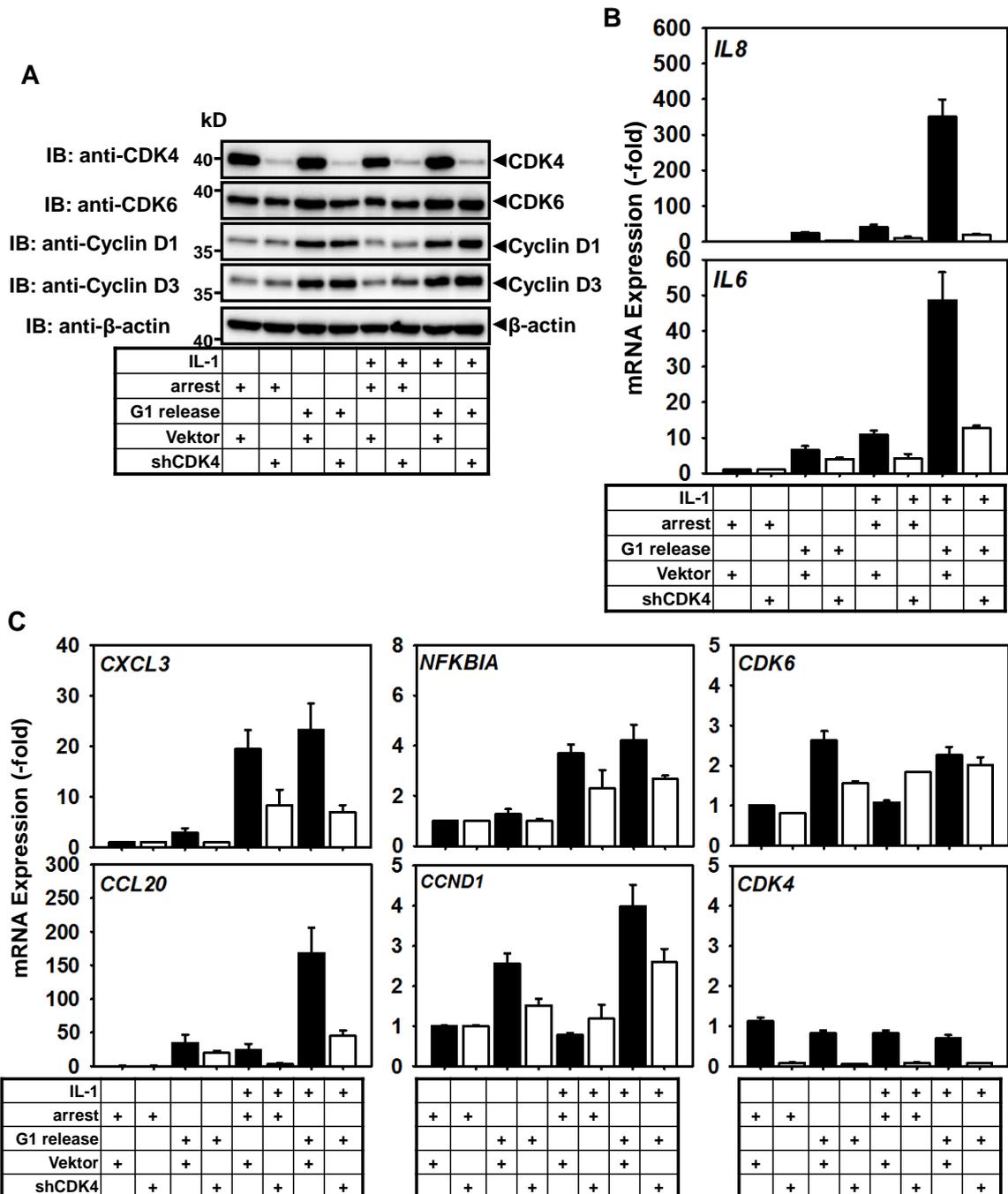


Abbildung 17: CDK4-abhängige Genexpression in synchronisierten Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden mit pSuper.Puro (Vektor) oder pSuper.Puro-shCDK4 (shCDK4) stabil transfiziert. Zellen wurden wie in Abb. 13A synchronisiert und behandelt. Zelllysate wurden im Western Blot analysiert. β -actin wurde als Beladungskontrolle verwendet. (B-C) Die RNA aus Vektorkontrolle und *CDK4*-Knockdown-Linie, wie unter (A) beschrieben, wurden auf Veränderung der inflammatorischen Genexpression durch RT-qPCR untersucht. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression \pm s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014).

Anschließend wurde auch die IL-1-induzierte Genexpression in unsynchronisierten *CDK4*-Knockdown-Zellen untersucht. Im Gegensatz zum *CDK6*-Knockdown war in unsynchronisierten *CDK4*-Knockdown-Zellen nur die Expression von *CCL20* leicht gehemmt, während bei anderen Genen kein Effekt zu sehen war (Abb. 18).

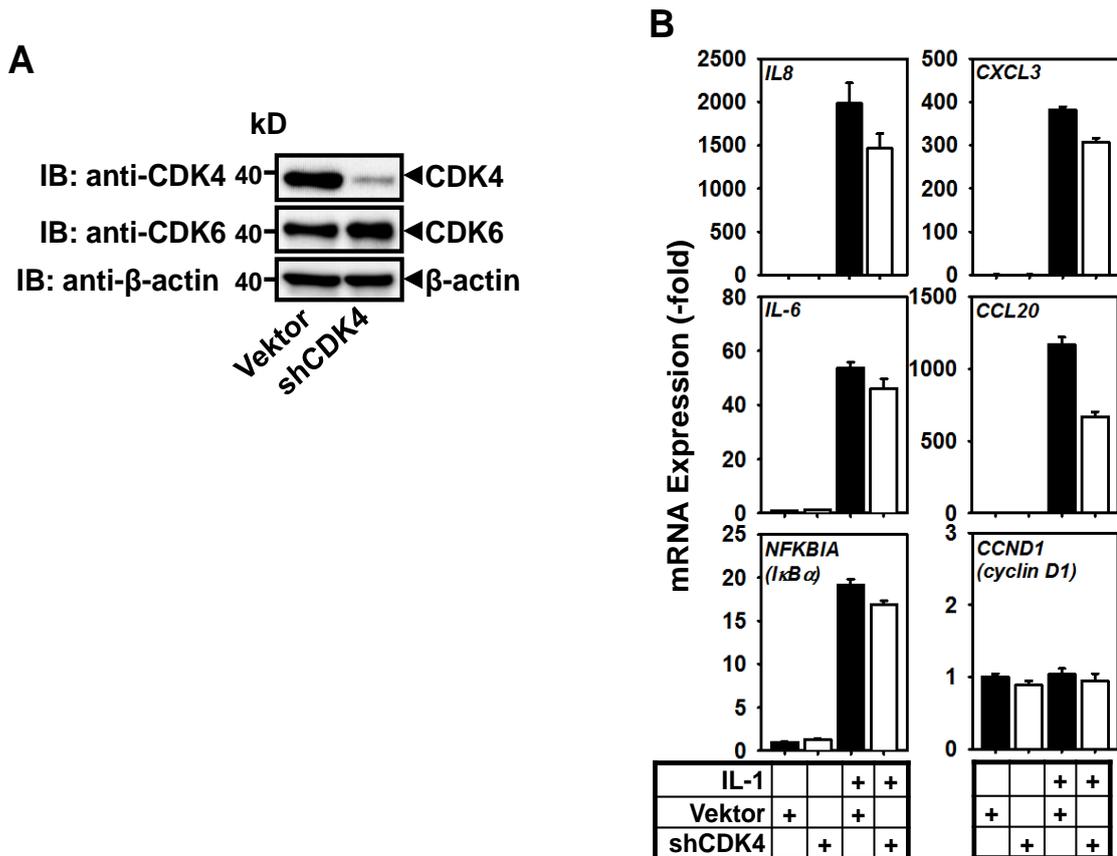


Abbildung 18: CDK4-abhängige Genexpression in unsynchronisierten Zellen. (A) Zellextrakte von unsynchronisierten Kontrollzellen (Vektor) und monoklonalen CDK4-Knockdown-Zellen (shCDK4) wurden mittels Western Blot analysiert. β-actin wurde als Beladungskontrolle verwendet. (B) Die beiden Zelllinien wurden 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) inkubiert. Die Expression der Gene wurde mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

4.3.3 Genomweite Unterschiede der IL-1 induzierten Genexpression zwischen monoklonaler shCDK4- und shCDK6-Linie

Um einen genomweiten Überblick über den Einfluss von CDK6 und CDK4 auf die Genexpression zu erhalten und den Einfluss beider Kinasen vergleichen zu können, wurden die monoklonalen Knockdown-Linien und Kontrolllinien genutzt, um vier parallele Microarray-Experimente durchzuführen, wobei die RNAs aus jeweils zwei biologisch unabhängigen Experimenten stammten. Die shCDK4- und shCDK6-Zellen wurden wie unter 4.2.3 beschrieben synchronisiert. Daraus ergab sich für die Microarray-Analyse n=4 für die Kontrollzellen und n=2 für die CDK-Knockdown-Zellen. Die Filterkriterien sind im Methodenteil unter 3.1.15 beschrieben. Die Microarray-Analysen zeigten, dass 34% bzw. 45% aller IL-1-induzierten Gene CDK6- oder CDK4-abhängig reguliert sind (Abb. 19A). Sieben dieser Gene waren sowohl CDK6- als auch CDK4-abhängig. Zu dieser Gruppe zählten *IL8*, *IL6* und *CCL20*. Die Daten

bestätigten somit die bereits durch RT-qPCR festgestellten Regulationsmechanismen dieser Gene. Von den durch G1 release aktivierten Genen waren nur 8% CDK6- bzw. 11% CDK4-abhängig, während von den durch G1 release + IL-1-Stimulation aktivierten Genen 11% eine CDK6- und 12% eine CDK4-Abhängigkeit aufwiesen (Abb. 19A). Die Daten des CDK6-Microarrays zeigten, dass von den insgesamt 692 CDK6-abhängigen Genen 334 verringert und 358 erhöht exprimiert wurden (Abb. 19B). CDK4 hingegen wurde für die Regulation von insgesamt 434 Genen benötigt (Expression von 232 Genen verringert und 202 Genen erhöht, Abb. 19B). Eine tabellarische Zusammenfassung der gefilterten Gene ist in Handschick et al. 2014 in der *Supplemental Table S2* zu finden.

Nur ein kleiner Teil der von CDK6 und CDK4 regulierten Gene wurde von beiden Kinasen beeinflusst. Eine *Gene Ontology*-Analyse der 123 Gene, die durch beide Kinasen reguliert werden, ergab einen großen Anteil an Genen, die für extrazelluläre Faktoren kodieren, wie z.B. Zytokine und Chemokine (Abb. 19C). Neben ihrer regulierenden Funktion im Zellzyklus haben CDK6 und CDK4 daher offensichtlich weitere und voneinander unabhängige Funktionen.

Da die CDK6-Überexpression das *IL8*-Gen induzierte und der *CDK6*-Knockdown sowohl in synchronisierten als auch in nicht-synchronisierten Zellen zu einer Suppression der IL-1-induzierten Genexpression führte, und CDK6 daher vermutlich eine fundamentalere Rolle bei der Regulation von inflammatorischer Genen spielte als CDK4, wurden weitere Experimente nur mit dieser Kinase durchgeführt.

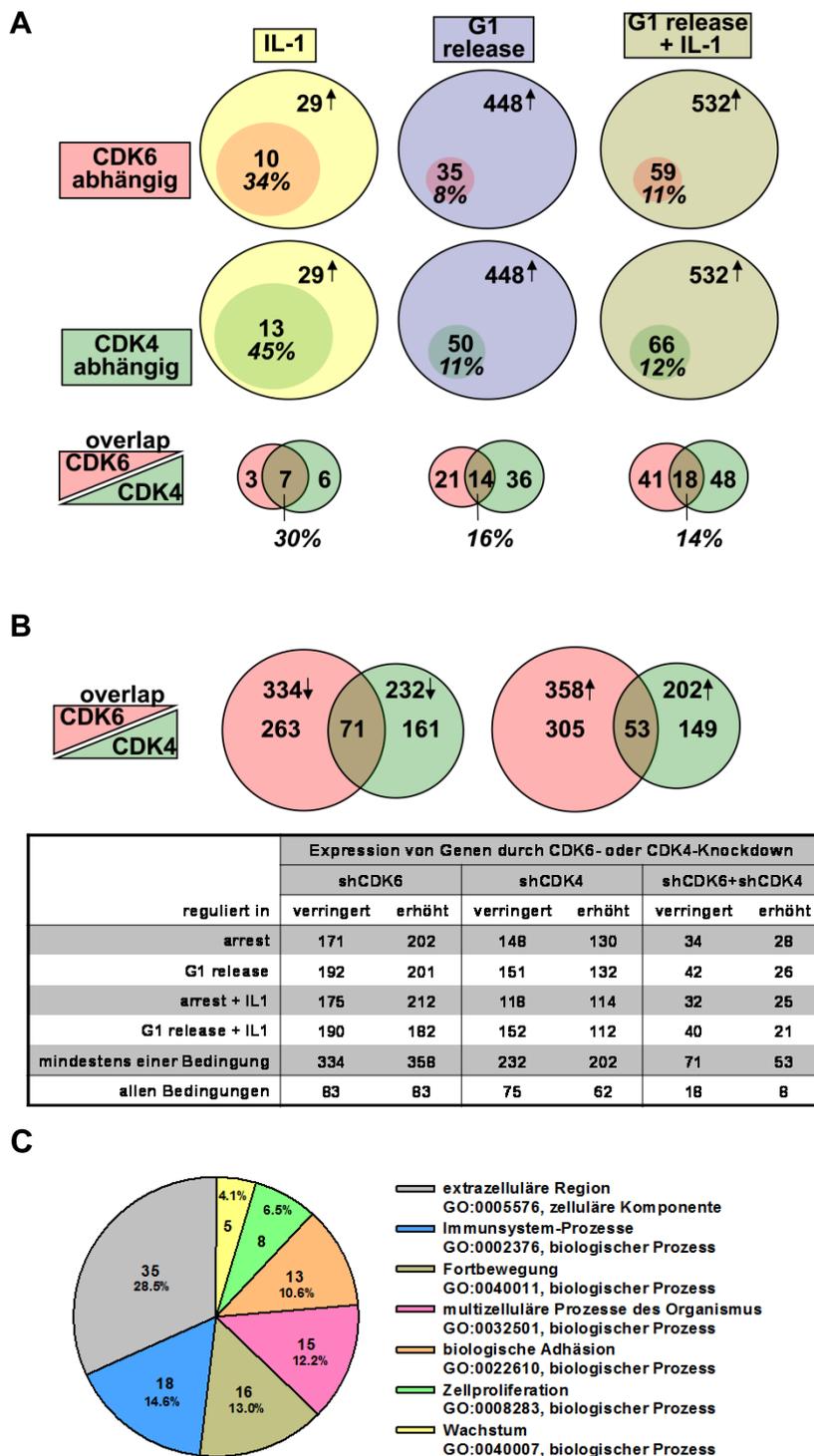


Abbildung 19: Genomweite Identifikation von CDK6- und CDK4-abhängigen Genen. (A) HeLa shCDK4 und shCDK6 monoklonale Linien wurden wie in Abb. 13A synchronisiert und behandelt. Die isolierten RNAs von zwei unabhängigen Experimenten wurden anhand von Microarrays analysiert. Die dargestellten Venn-Diagramme und Zahlen zeigen zellzyklus- oder IL-1-induzierte Gene, ihre Überlappung (*overlap*) und ihre Abhängigkeit von CDK6, CDK4 oder beiden Kinasen. **(B)** Venn-Diagramme des gleichen Microarray-Datensatzes zeigen die generelle Anzahl CDK6- und CDK4-regulierter Gene. Die regulierten Gene wurden gezählt und die Anzahl in der Tabelle zusammengefasst (Filterkriterien unter 3.1.15). **(C)** *Gene Ontology* (GO)-Analyse von 123 Genen, die sowohl durch shCDK4- als auch shCDK6-Knockdown reguliert sind. Dargestellt sind Gene, welche eindeutig zugeordnet werden konnten. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

4.4 Untersuchung der zellzyklusspezifischen Regulation TNF α -induzierter Gene durch CDK6

Da die Expression inflammatorischer Gene durch IL-1 von CDK6 abhängig war, stellte sich auch die Frage, ob dieses auch für andere Zytokine der Fall war. TNF α ist neben IL-1 der wichtigste Regulator inflammatorischer Gene und wurde aus diesem Grund genauer untersucht. Um dabei einen noch tieferen Einblick in die zellzyklusabhängige Genexpression auf Einzelzellebene zu bekommen, wurden HeLa-Fucci-Zellen (*fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator* (Sakaue-Sawano et al. 2008)) für die folgenden Versuche verwendet. Fucci-Zellen basieren auf der zellzyklusabhängigen Proteolyse der Proteine Geminin und Cdt1. Eine trunkierte Version von Cdt1 (30-120) wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff mKO2 (*monomeric version of Kusabira Orange 2*) und eine verkürzte Version von Geminin (1-110) mit dem Fluoreszenzfarbstoff mAG (*monomeric version of Azami Green*) fusioniert. Diese Konstrukte wurden stabil in HeLa-Zellen transfiziert (Sakaue-Sawano et al. 2008). Die so entstandenen Fucci-Zellen exprimieren farbige, zellzyklusabhängige Indikatoren, die es ermöglichen den Zellzyklusstatus jeder einzelnen Zelle sichtbar zu machen (Abb. 20). Durch die Expression von mKO2-hCdt1(30-120) während der G1-Phase und die gleichzeitige Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von mAG-hGem (1-110) leuchten die Zellen rot. In der S-, G2- und M-Phase dominiert mAG-hGem (1-110), so dass die Zellen in diesen Phasen grün leuchten. Am Übergang von der G1- zur S-Phase sind beide Proteine in geringem Maße vorhanden, was wiederum zu einer gelblich-orangen Färbung führt (Abb. 20). Kurz nach der Mitose sind weder Geminin noch Cdt1 vorhanden, so dass diese Zellen keine Färbung aufweisen.

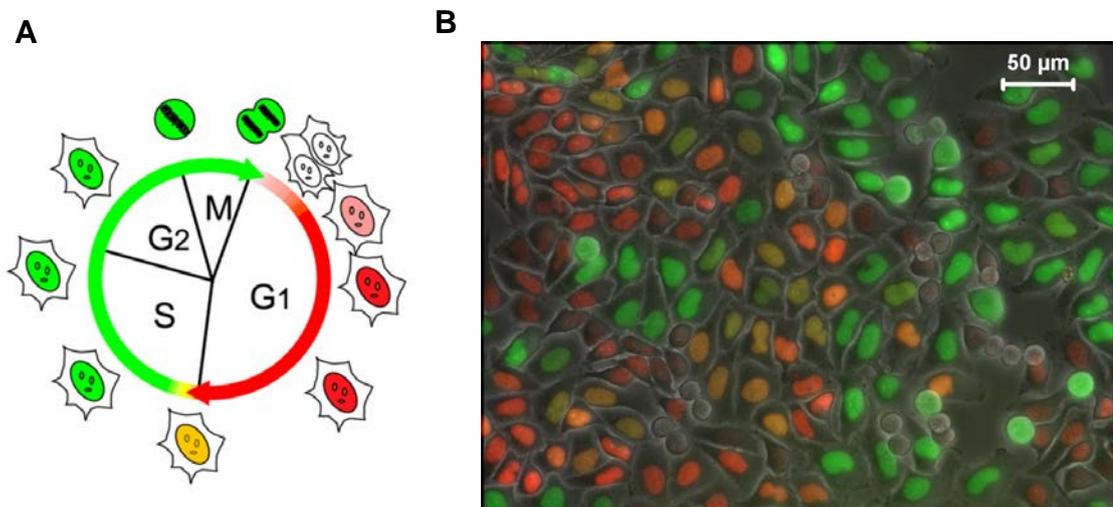


Abbildung 20: HeLa-Fucci-Zellen. (A) Schematische Darstellung der fluoreszierenden Fucci-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen (Sakaue-Sawano et al. 2008). (B) Fluoreszenzaufnahme von unsynchronisierten HeLa-Fucci-Zellen.

4.4.1 Charakterisierung eines stabilen *CDK6*-Knockdowns in HeLa-Fucci-Zellen

Um einen *CDK6*-Knockdown in HeLa-Fucci-Zellen analysieren zu können, wurden von Helmut Müller, AG Kracht, monoklonale Fucci-Zellen generiert, die stabil mit einer shRNA gegen *CDK6* transfiziert wurden (HeLa-Fucci-pS-sh*CDK6* K03). Die Charakterisierung dieser Zelllinie ergab im Vergleich zur Kontrolllinie einen starken Knockdown von *CDK6* auf Protein- und mRNA-Ebene (Abb. 21A, B), der TNF α - und zellzyklusunabhängig war und keinen Einfluss auf die Menge an *CDK4* hatte. Wie in Abbildung 21D zu sehen ist, befanden sich etwa 65% der gehungerten (ohne FKS) Fucci-Zellen im G1 arrest. Dieser Wert lag bei G1 release Zellen bei etwa 30%. Der Knockdown von *CDK6* zeigte keinen Einfluss auf die zellzyklusabhängige Verteilung der synchronisierten Zellen. Bei der HeLa-Fucci-sh*CDK6* K03-Linie war allerdings die TNF α -induzierte *IL8*, *IL6* und *CXCL3* mRNA-Expression sowie die *I κ B α* - und *Cyclin D1*-Expression gehemmt. *CCL20* wurde nur in TNF α -stimulierten arretierten Fucci-*CDK6*-Knockdown-Zellen gehemmt. (Abb. 21C). Diese Befunde wurden nicht nur in den monoklonalen Linien, sondern auch in den zuvor generierten Zellpools nachgewiesen (Daten in Handschick et al. 2014).

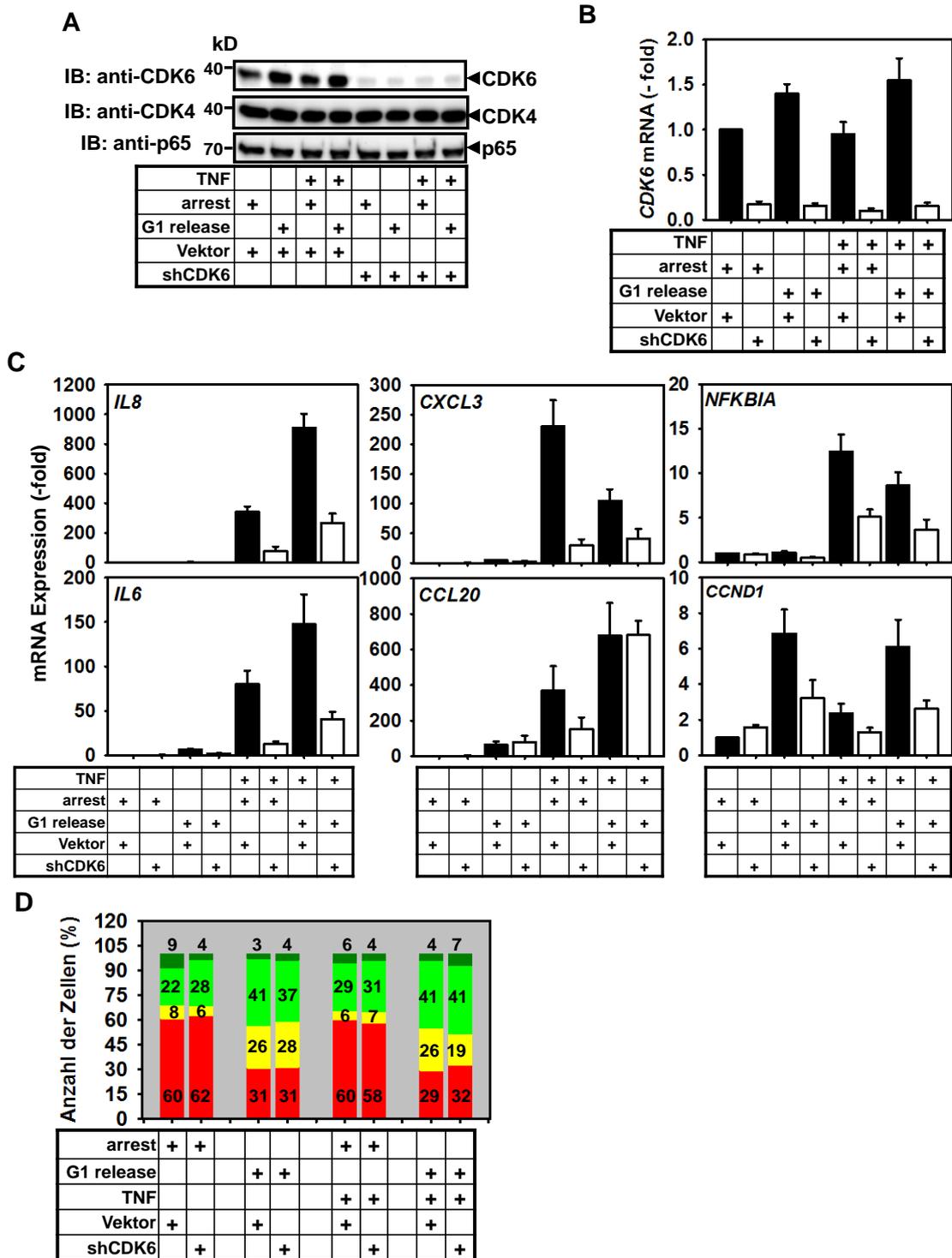


Abbildung 21: TNF α -induzierte Genexpression in einer monoklonalen synchronisierten HeLa-Fucci-shCDK6-Linie. (A) Stabil transfizierte HeLa-Fucci-Kontrollzellen (Vektor) und HeLa-Fucci-pS-shCDK6 K03-Zellen (shCDK6) wurden wie in Abb. 13A synchronisiert und 30 min mit/ohne TNF α (20 ng/ml) behandelt. Zelllysate wurden im Western Blot analysiert. p65 wurde als Beladungskontrolle verwendet. (B, C) Analyse der mRNA auf Veränderung der inflammatorischen Genexpression durch RT-qPCR. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von drei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle. (D) Zellzyklusphasen der Fucci-Kontrolllinie (Vektor) und Fucci-pS-shCDK6 K03-Zellen (shCDK6) wurden für alle arrest und G1 release Bedingungen +/- TNF α durch Zählen von mindestens 500 Zellen bestimmt. Die Farben entsprechen den folgenden Zellzyklusphasen: rot, G1; gelb, G1/S; hellgrün, S/G2; dunkelgrün, Mitose. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

4.4.2 Analyse TNF α -induzierter Genexpression in Fucci-shCDK6-Zellen mittels LMD

Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion ist es möglich gezielt Zellen zu isolieren, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befinden (Abb. 22). Mit einer definierten Anzahl von ausgeschnittenen Zellen wurde durch Einzelzell-RT-qPCR (siehe 3.1.14) die Zellzyklus- und TNF α -induzierte Genexpression gemessen.

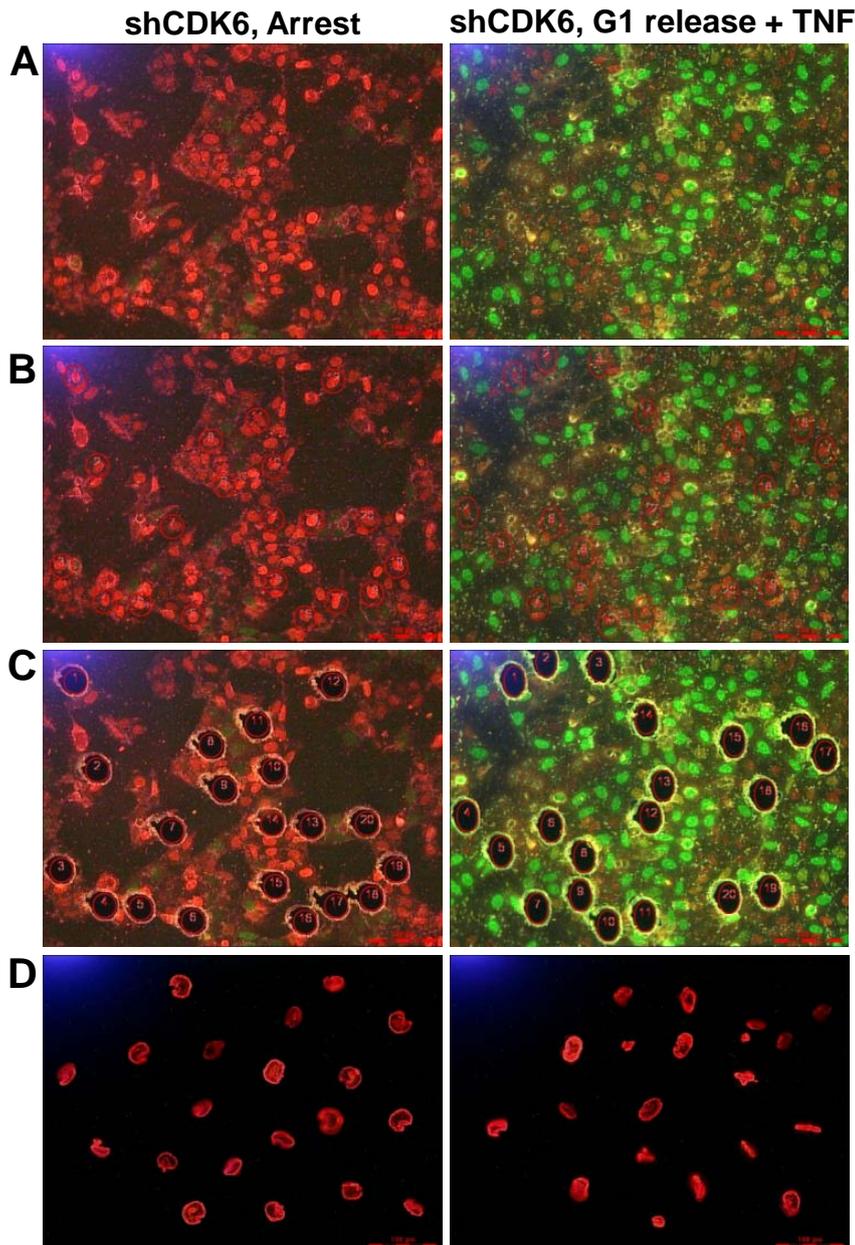


Abbildung 22: LMD-basierte Isolation von Zellen. Bilder der monoklonalen HeLa-Fucci-pS-shCDK6 K03-Linie. Linkes Panel: Aufnahmen nach 48 h Serumentzug (arrest). Rechtes Panel: G1 release Zellen mit 30 min TNF α -Stimulation. Die Bilder zeigen einen ausgewählten Bereich vor der LMD (A), nach der Markierung ausgewählter Zellen (roter Kreis) (B), nach dem Ausschneiden mittels LMD (C) und die Validierung der gesammelten Zellen im Deckel eines 0,2 ml Gefäßes (D).

spezifisch in der G1- und S/G2-Phase gehemmt waren. Für *IL6* konnte auch in arretierten Zellen plus $\text{TNF}\alpha$ eine CDK6-abhängige Expression in der G1-Phase gezeigt werden (Daten in Handschick et al. 2014).

Auch in der Analyse der Genexpression nicht-synchronisierter Zellen mittels LMD ließ sich der *CDK6*-Knockdown in jeder Zellzyklusphase nachweisen (Abb. 24). Die mRNA-Expression von *Cyclin D1* und *IkB α* blieb auch hier unbeeinflusst, während die *IL8* mRNA-Expression signifikant im *CDK6*-Knockdown in der G1-Phase gehemmt war.

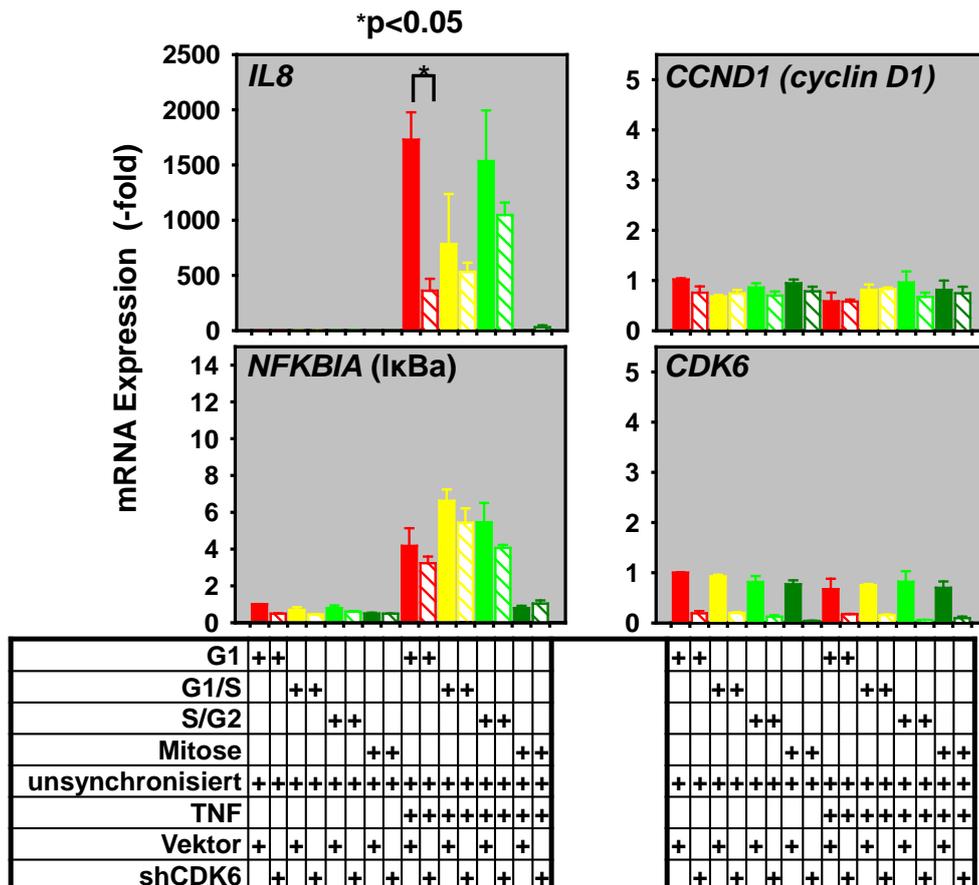


Abbildung 24: LMD-basierte Analyse von unsynchronisierten Fucci-pS-shCDK6 K03-Zellen. Fucci-Kontrollzellen (Vektor) und Fucci-pS-shCDK6 K03-Zellen (shCDK6) blieben unbehandelt oder wurden 30 min mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Mittels LMD wurden die Zellen isoliert und die mRNA-Expression der dargestellten Gene durch RT-qPCR analysiert (siehe Abb. 22). Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle, in denen jeweils 50 Zellen pro Zellzyklusstadium analysiert wurden (modifiziert nach Handschick et al. 2014).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus 4.3 und 4.4, dass die zellzyklusabhängige Regulation der inflammatorischen Genexpression sowohl in IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Zellen stattfindet. Die IL-1- oder $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Genexpression ist in den individuellen Zellzyklusphasen durch einen CDK6-abhängigen Signalweg geregelt.

Der CDK4-abhängige Signalweg beeinflusst ebenfalls zellzyklusabhängig die Regulation inflammatorischer Gene, jedoch wird nur ein kleiner Teil dieser

Gene von beiden Kinasen beeinflusst. Ein Überblick über die gewonnenen Befunde ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

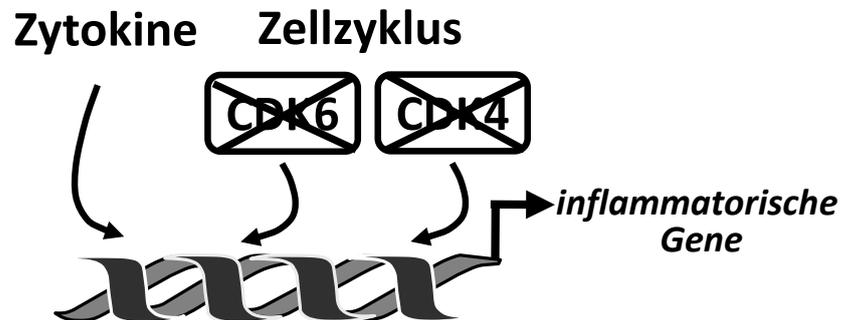


Abbildung 25: CDK6 und CDK4 beeinflussen die zellzyklusabhängige Regulation inflammatorischer Gene. Im *loss-of-function*-Modell konnte gezeigt werden, dass die beiden G1-abhängigen Kinasen CDK6 und CDK4 die Expression inflammatorischer Gene zellzyklusabhängig aktivieren. Beide Kinasen haben außerdem weitere nicht-überlappende genregulatorische Funktionen neben dem Zellzyklus.

4.5 Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges durch CDK6

Die Suppression IL-1- und TNF-induzierter Gene in der Abwesenheit von CDK6 führte zu der Frage, ob CDK6 an einem zentralen Mechanismus dieser Genregulation beteiligt ist. Da NF- κ B ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Regulierung der inflammatorischen Genexpression ist, wurde im Folgenden untersucht, ob der genregulatorische Effekt von CDK6 in Zusammenhang mit NF- κ B steht.

4.5.1 Interaktion und Kollokalisierung von CDK6 mit p65

Die transkriptionelle Aktivierung der Zielgene von IL-1 und TNF α erfolgt meist durch die Aktivierung der NF- κ B Untereinheit p65. Deshalb wurde zunächst versucht eine mögliche Interaktion von CDK6 mit p65 in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten mittels fraktionierter Lyse und anschließender Immunpräzipitation nachzuweisen (Helmut Müller, AG Kracht). In Abbildung 26A (oben) ist zu erkennen, dass in transfizierten Zellen, die HA-CDK6 und GFP-p65 überexprimieren, beide Proteine im Cytosol, in der löslichen Kernfraktion und in der Chromatinfraktion in etwa gleichen Mengen detektiert wurden. Eine Koimmunopräzipitation beider Proteine konnte jedoch ausschließlich bei der Chromatinfraktion festgestellt werden (Abb. 26A, unten). Fluoreszenzaufnahmen von überexprimiertem GFP-p65 und endogenem CDK6 bestätigten diesen Befund (Abb. 26B). p65 kollokalisierte primär mit CDK6 in distinkten nukleären Bereichen (Dr. Knut Beuerlein, AG Kracht).

Im Gegensatz dazu konnte die bereits charakterisierte Interaktion von CDK6 mit Cyclin D1 und D2 spezifisch im Cytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 26A).

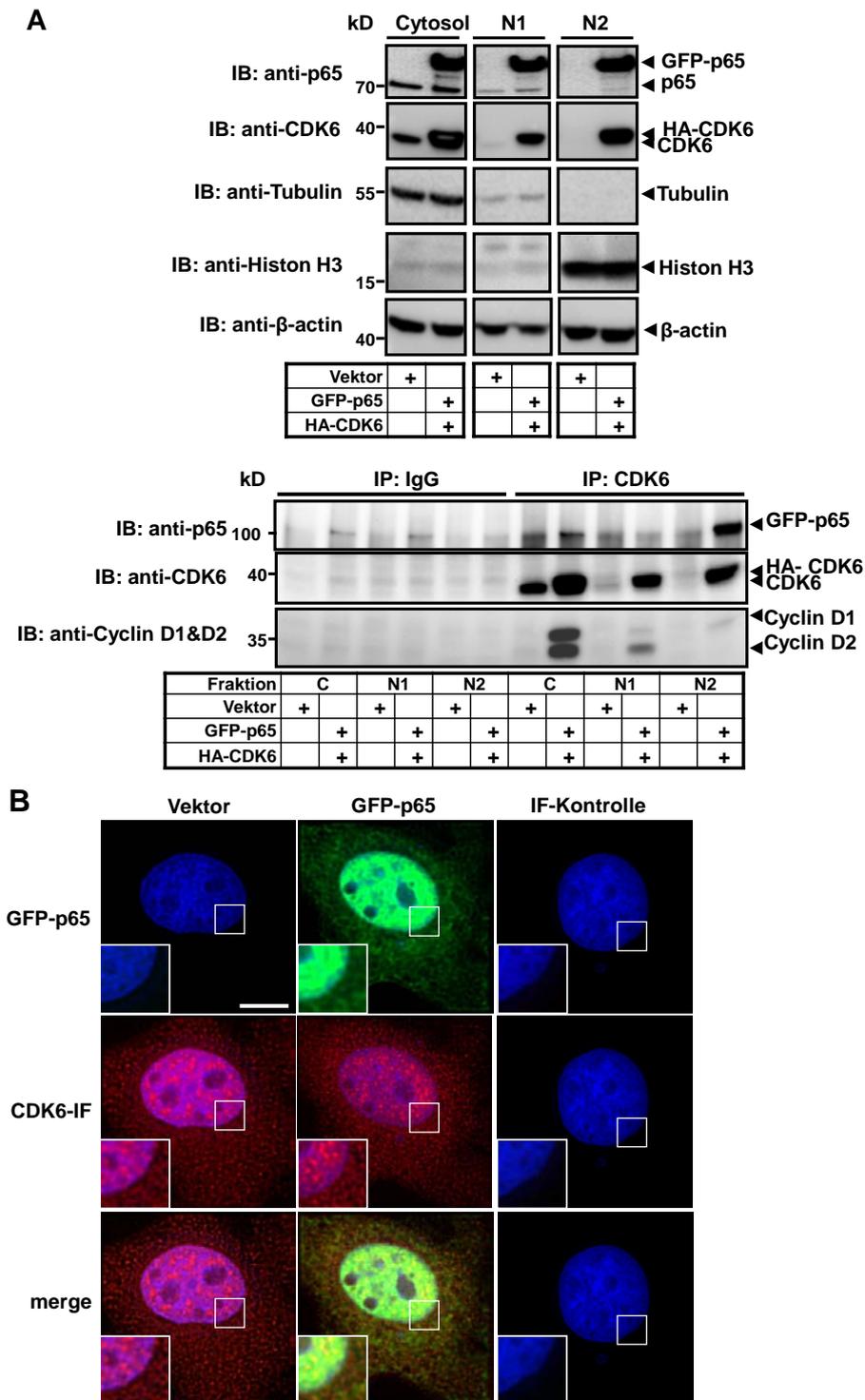


Abbildung 26: CDK6 interagiert und kolokalisiert mit p65 im Überexpressionssystem. (A) HeLa-Zellen wurden mit GFP-p65 und HA-CDK6 Konstrukten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und in cytosolische (C), lösliche Kernproteine (N1) und unlösliche Chromatinfraction (N2) getrennt. Die zelluläre Verteilung von CDK6 und p65 wurde mittels Western Blot analysiert. Antikörper gegen Tubulin, Histon H3 und β-actin wurden verwendet, um die Reinheit der einzelnen Fraktionen und gleiche Beladung nachzuweisen (oben). Die Fraktionen wurden für eine CDK6-Immunpräzipitation verwendet (unten). CDK6-interagierende Proteine wurden mittels Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. **(B)** HeLa-Zellen wurden mit GFP-p65 oder Kontrollvektor transfiziert. Subzelluläre Lokalisation von GFP-p65 und endogenem CDK6 wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die vergrößerten Bereiche zeigen die Lokalisation von CDK6 und GFP-p65 in nukleären Bereichen. IF-Kontrolle = ohne Primärantikörper, Balken: 10 μm (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014).

Eine Koloalisation von endogenem CDK6 und endogenem p65 im Kern konnte nach einem IL-1-Stimulus spezifisch mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 27A). Ein Nachweis der Interaktion von CDK6 und p65 auf endogener Ebene durch Immunopäzipitation war allerdings nicht möglich (Abb. 27B). Die aus der Literatur bekannten Interaktionen von CDK6 mit Cyclin D3 (Bockstaele et al. 2009) und von p65 mit I κ B α (Schmitz et al. 2004, Solt and May 2008) waren jedoch deutlich zu erkennen (Abb. 27B). Eine alternative Methode zum Nachweis einer CDK6:p65-Interaktion ist der hoch sensitive *proximity ligation assay* (PLA) (siehe 3.4.2), der auch schwache oder wenig vorhandene endogene Bindungen detektieren kann. Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 28A dargestellt. Mit dieser Methode konnte eine eindeutige Interaktion von CDK6 und p65 nachgewiesen werden (Abb. 28B). Die Gesamtzahl der Immunkomplexe pro Zelle nahm nach IL-1-Stimulation nicht zu, aber eine IL-1-abhängige intrazelluläre Umverteilung der Signale war festzustellen. In unbehandelten Zellen fand die Interaktion zwischen p65 und CDK6 zu über 80% im Cytosol statt, während nach IL-1-Stimulation mehr als die Hälfte der Interaktionen im Kern nachweisbar war (Abb. 28B). Die Spezifität des Assays wurde durch eine Reihe von parallel durchgeführten Negativkontrollen überprüft. So führte das Weglassen eines oder beider Primärantikörper dazu, dass kein Signal mehr detektiert wurde (Abb. 28C).

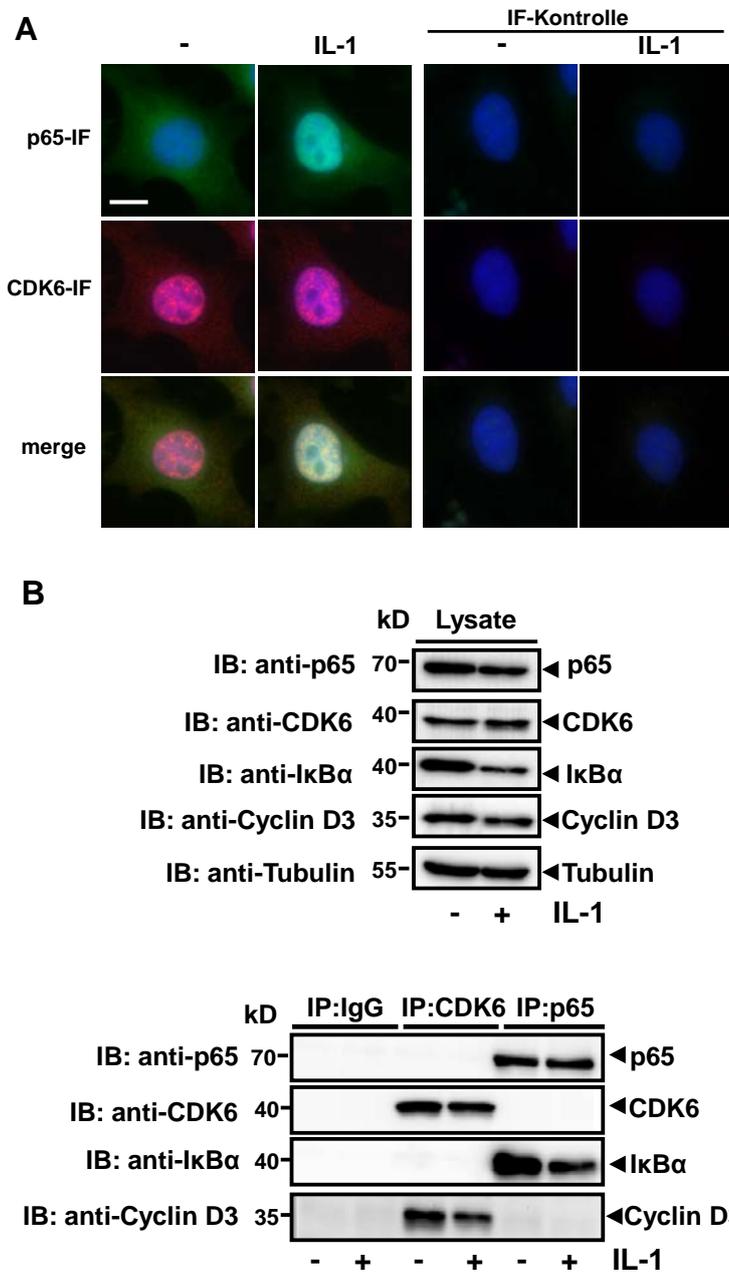


Abbildung 27: Kolokalisation von endogenem CDK6 und p65, aber fehlende Koimmunopräzipitation. (A) HeLa-Zellen wurden in μ -Slides VI ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Die subzellulären Lokalisationen von endogenem p65 und CDK6 wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. IF-Kontrolle = ohne Primärantikörper, Balken: 10 μ m **(B)** KB Zellen wurden für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) stimuliert, lysiert und die entsprechenden Proteine wurden mittels Western Blot nachgewiesen. Lysate wurden für Immunpräzipitationen von CDK6 und p65 verwendet. Die IgG-IP wurde als Negativkontrolle verwendet. CDK6- und p65-interagierende Proteine wurden mit den dargestellten Antikörpern nachgewiesen.

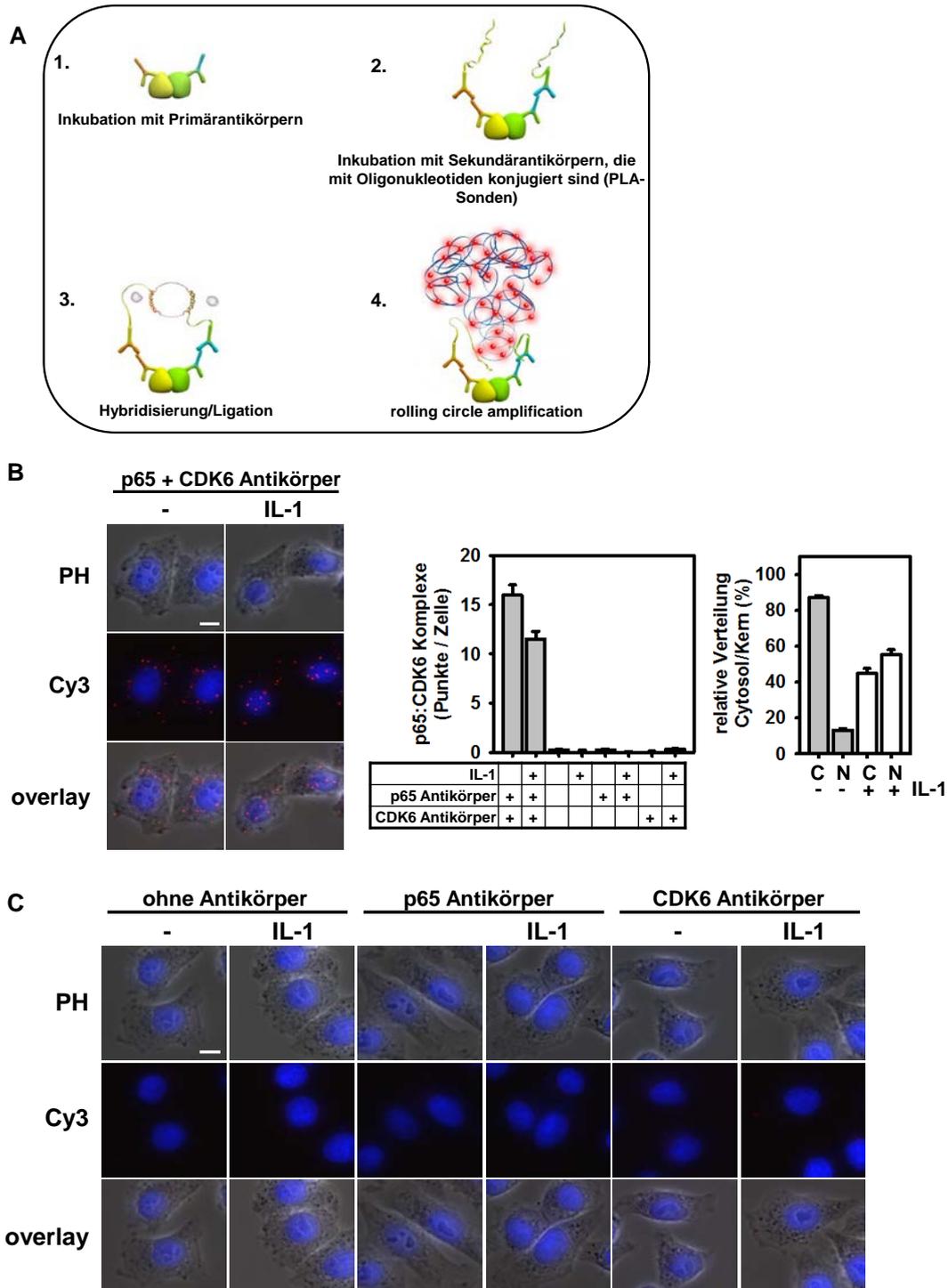


Abbildung 28: Nachweis der endogenen Interaktion und Kolokalisation von p65 und CDK6 mittels PLA. (A) Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines PLA-Assays (OLINK Bioscience) (B) KB Zellen wurden in μ -Slides VI ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Antikörper gegen p65 und CDK6 wurden verwendet, um intrazelluläre Interaktionen mittels PLA zu detektieren. In der linken Grafik sind die gezählten positiven Fluoreszenzsignale von mindestens 150 Zellen als Mittelwert pro Zell \pm s.e.m. dargestellt. Die rechte Grafik zeigt die relative Verteilung von positiven Punkten vor und nach IL-1-Behandlung im Cytosol (C) und Kern (N). Balken: 10 μ m (C) Repräsentative Bilder von Negativkontrollen (ohne Primärantikörper oder mit einem Primärantikörper) des in (B) erläuterten PLA Versuchs. Die Bilder zeigen Phasenkontrast (PH), Fluoreszenzaufnahmen mit einem Cy3 Filter (Cy3) und die Überlappung (*overlay*) dieser Bilder. Analoge Ergebnisse wurden in insgesamt drei unabhängigen Versuchen erhoben. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass p65 und CDK6 im Überexpressionssystem hauptsächlich in nukleären Kompartimenten interagieren und kolokalisieren. Eine endogene Kolokalisation findet sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern statt und nimmt IL-1-abhängig im Kern zu.

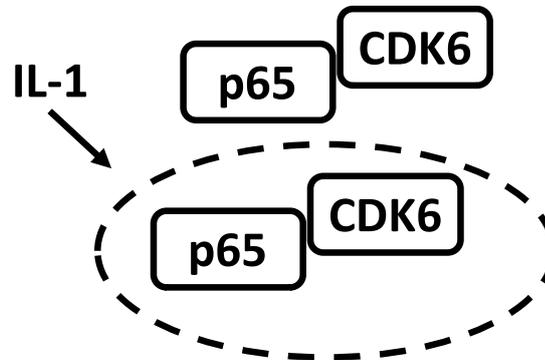


Abbildung 29: p65 und CDK6 interagieren und kolokalisieren. Die unter 4.5.1 aufgeführten Ergebnisse zeigen deutlich eine IL-1-abhängige Interaktion von CDK6 mit p65.

4.5.2 Einfluss des CDK6-Knockdowns auf die p65-Ser536-Phosphorylierung in synchronisierten Zellen

Die Aktivität von p65 wird u.a. durch die Phosphorylierung des Serin an Position 536 reguliert (Buss et al. 2004, Schmitz et al. 2004). Aufgrund der Kolokalisation und Interaktion von p65 mit CDK6 (Abb. 26, 27, 28) und den zuvor in der Arbeitsgruppe gemachten Beobachtungen, dass CDK6 *in vitro* eine direkte Kinase von p65 ist, wurde der Einfluss eines *CDK6*-Knockdown auf die p65-Ser536-Phosphorylierung genauer untersucht.

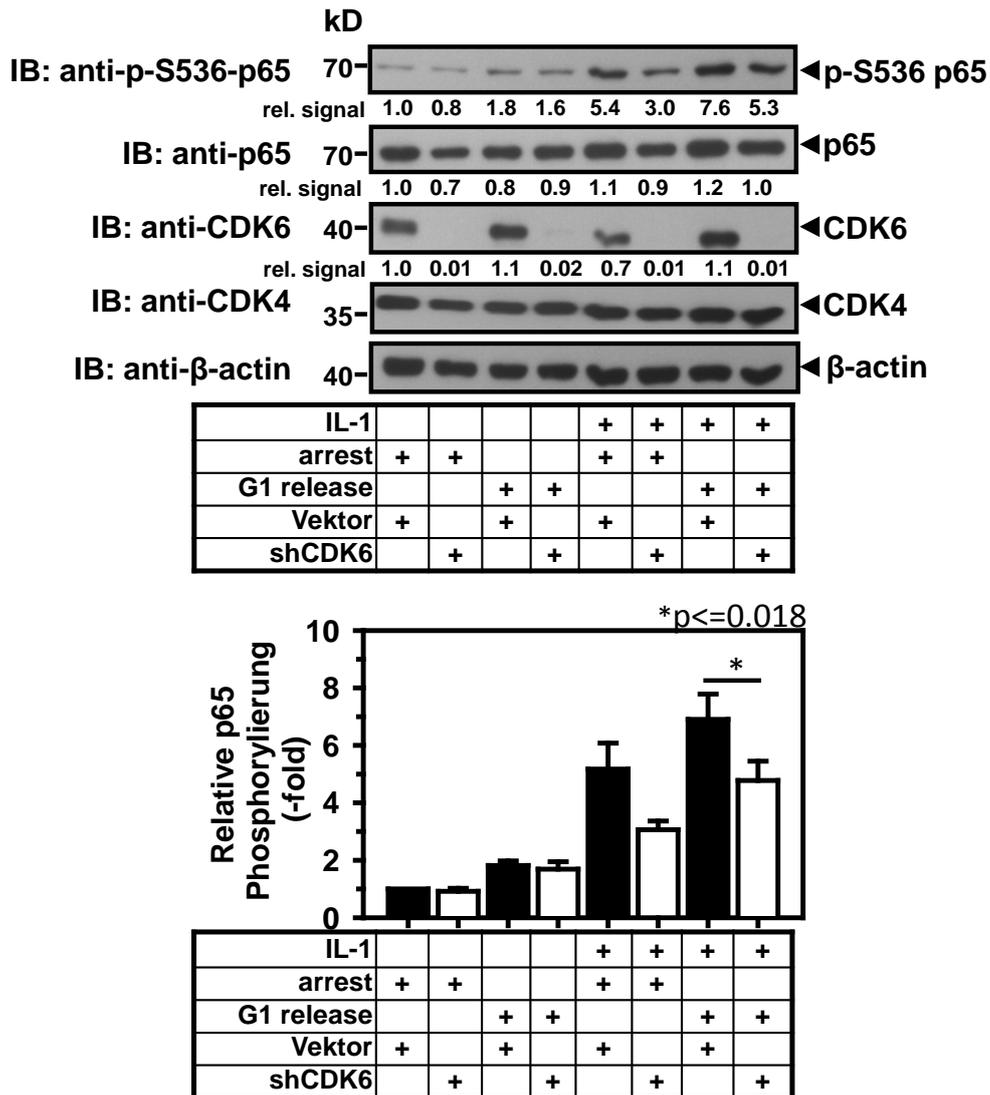


Abbildung 30: Einfluss des CDK6-Knockdowns auf die Ser536-Phosphorylierung von p65 in synchronisierten Zellen. Stabil transfizierte HeLa-Kontrollzellen und shCDK6-Zellen wurden wie beschrieben synchronisiert und 30 min mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm s.e.m. der relativen Ser536-Phosphorylierung normiert auf die totale p65 Proteinmenge aus drei unabhängigen Experimenten (modifiziert nach Buss et al. 2012).

In synchronisierten HeLa-Zellen war die Menge an phosphoryliertem Ser536 in arretierten Zellen sehr gering. Bei Zellen mit G1 release war eine um das Zweifache erhöhte Ser536 Phosphorylierung zu sehen. Die IL-1-stimulierten arretierten Zellen zeigten eine fünffach höhere p65-Ser536-Phosphorylierung. Zellen, die sowohl den G1 release als auch den IL-1-Stimulus erhielten zeigten eine Erhöhung der Phosphorylierung um den Faktor 7. In der CDK6-Knockdown-Linie hingegen war sowohl bei den Ansätzen mit IL-1 allein als auch Serum mit IL-1 die Phosphorylierung von Ser536 signifikant geringer (Abb. 30).

4.5.3 Verstärkte Transkription durch Gal4-p65 mit aktivem CDK6 S178P

Um die CDK6-abhängige Regulation der p65 Aktivität noch genauer zu untersuchen, wurden Versuche mit einem Gal4-Promotor-abhängigen Luziferasekonstrukt durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mit dem Reporter-genkonstrukt (Luziferase unter der Kontrolle des Gal4-Promotors), CDK6 wt oder CDK6 S178P (\pm pXPRESS-Cyclin D3), aufsteigenden Mengen pGal-4-p65 (exprimiert das entsprechende Fusionsprotein) sowie zur Normierung mit pSV40- β -Gal (konstitutiv exprimierte β -Galaktosidase) transient kotransfiziert (Abb. 31). Die Kotransfektion von CDK6 S178P und Cyclin D3 verstärkte die Gal-4-p65-Fusionsprotein vermittelte Transkription der Luziferase, während CDK6 wt in diesem Assay keinen verstärkenden Effekt auf die Transkription zeigte. Die Negativkontrollen (Ansätze ohne pGal4-p65) zeigten keinen Anstieg der Luziferaseaktivität. Die gleichmäßige Proteinexpression von Gal4-p65, p65 und den verwendeten CDK6-Konstrukten war im Western Blot nachweisbar (Abb. 31). Diese Daten lassen vermuten, dass die katalytische Aktivität von CDK6 erforderlich ist, um die nukleäre Aktivität von p65 unabhängig von seiner DNA-Bindung zu verstärken.

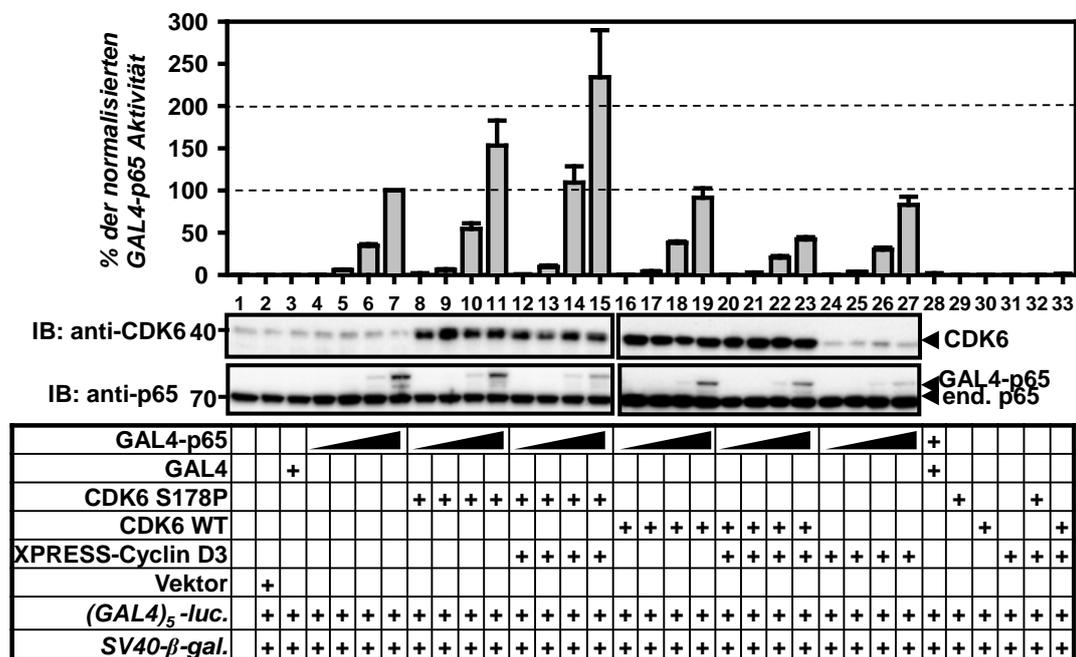


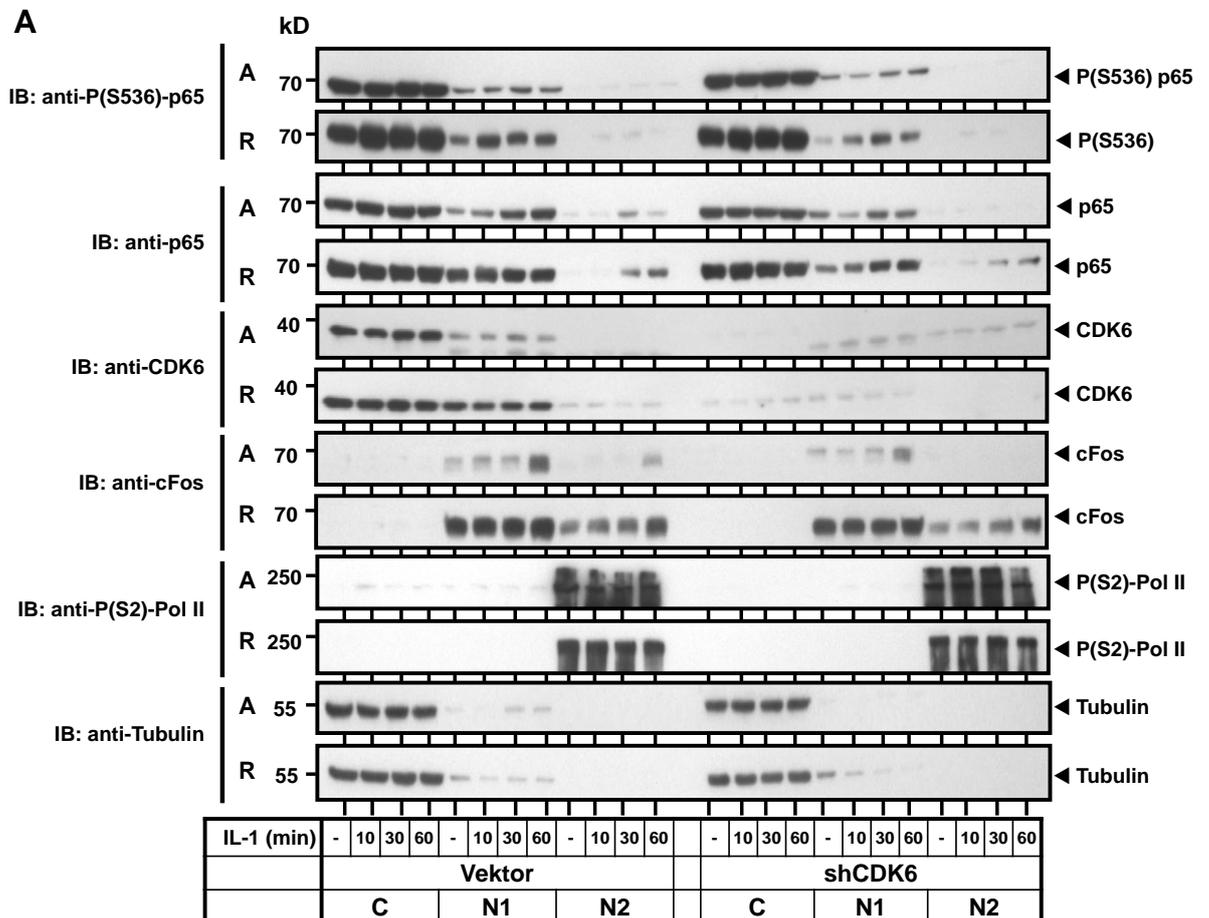
Abbildung 31: Verstärkte Gal4-p65 Reporter-genaktivität durch CDK6 S178P. HeLa-Zellen wurden mit zunehmenden Mengen an Gal4-p65 (0,002; 0,02; 0,2 und 1 μ g DNA) allein oder in Kombination mit 2 μ g CDK6 wt, CDK6 S178P oder Cyclin D3 transient transfiziert. 1 μ g Gal4-Luziferase und 1 μ g SV40- β gal wurden kotransfiziert. Als Negativkontrollen wurden untransfizierte Lysate (Spalte 1), Vektor allein (Spalte 2), Gal4-cDNA-kodierendes Plasmid allein (Spalte 3, 27) oder Proben ohne Gal4-p65 (Spalte 29-33) verwendet. Dargestellt ist die normalisierte Luziferaseaktivität \pm s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten. Gleichzeitig wurde die Expression von Gal4-p65, endogenem p65 und der CDK6-Konstrukte mittels Western Blot analysiert.

4.6 Charakterisierung von Signalen, die die nukleäre Lokalisation und Chromatinassoziation von CDK6 regulieren

Die Interaktion und Kolokalisation von CDK6 mit p65 deuten stark auf eine nukleäre Funktion von CDK6 hin, die im nächsten Abschnitt durch verschiedene Experimente näher untersucht werden sollte.

4.6.1 Zellzyklus- und zytokinregulierte subzelluläre Lokalisation von p65 und CDK6

Zunächst sollte mittels fraktionierter Lyse geklärt werden, ob die subzelluläre Verteilung von endogenem CDK6 und p65 IL-1 und/oder zellzyklusabhängig reguliert wird.



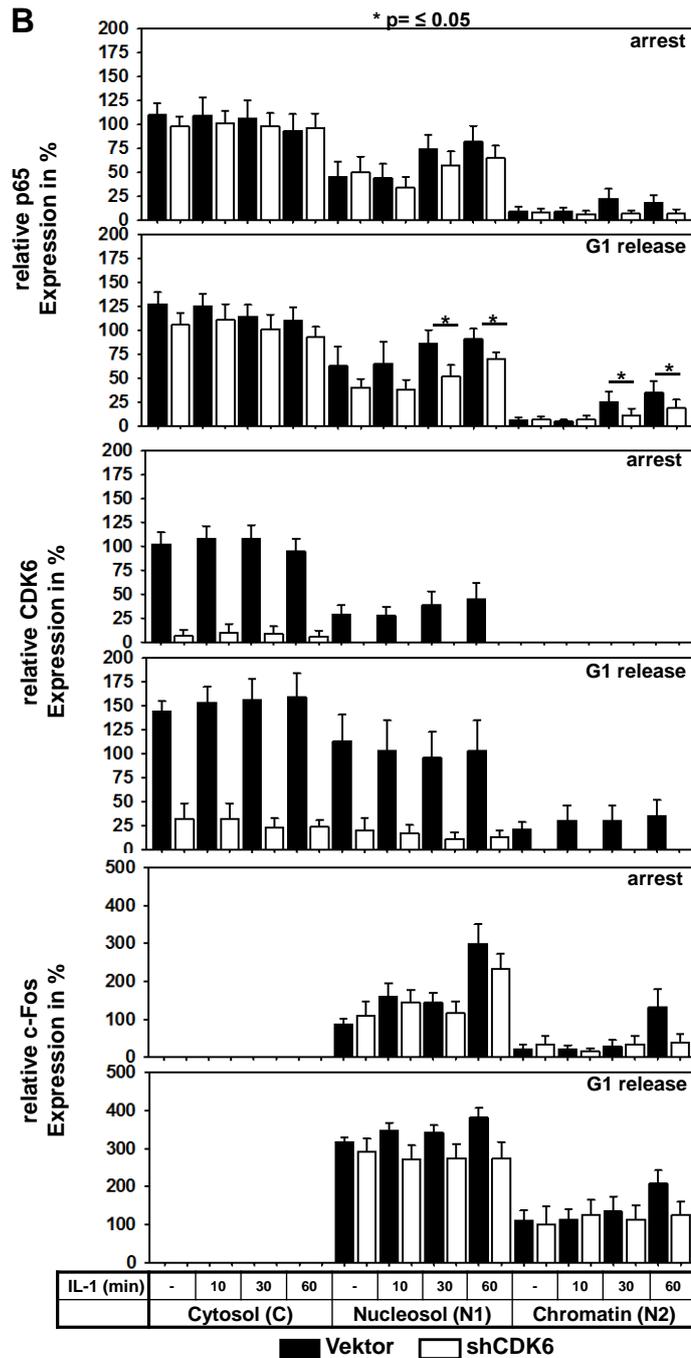


Abbildung 32: Subzelluläre Lokalisation von p65 und CDK6. (A) Stabile Vektorzellen (Vektor) und CDK6-Knockdown-Zellen (shCDK6) wurden wie in Abb. 12A beschrieben synchronisiert (A = arrest Zellen, R = G1-release Zellen) und für verschiedene Zeitpunkte mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Die cytosolische (C), nukleäre (N1) und Chromatin-Fraktion (N2) wurden generiert und gleiche Proteinmengen mittels Western Blot analysiert. (B) Quantitative Analyse der CDK6 p65 und c-Fos Signale aus (A). Gezeigt sind die Mittelwerte +/- s.e.m der relativen Proteinmengen in % normiert auf die Kontrolle (Vektor, Cytosol, Arrest, kein IL-1) von drei unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

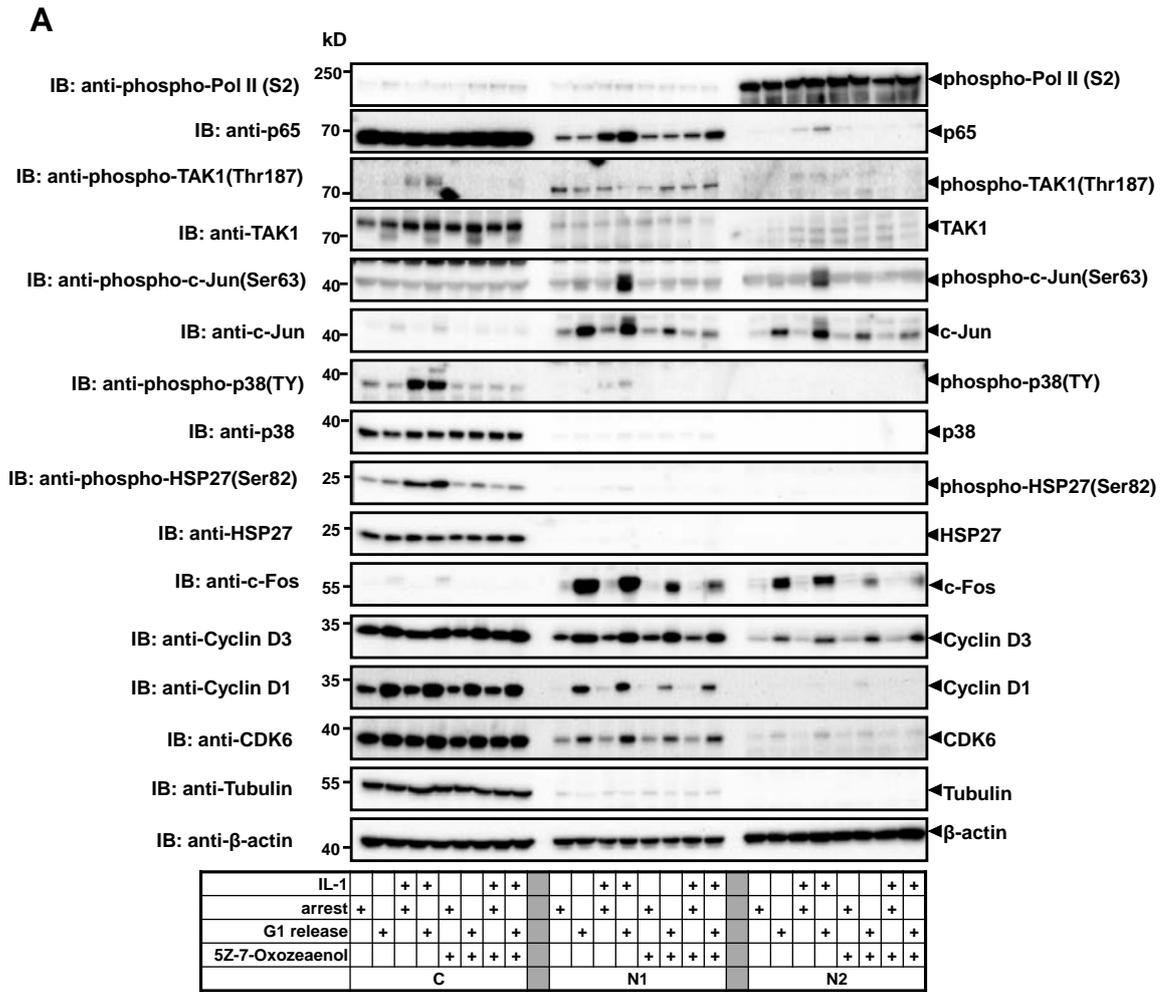
In Abbildung 32 ist die fraktionierte Lyse von synchronisierten stabilen CDK6-Knockdown und Kontrolllinien dargestellt, die unterschiedlich lange mit IL-1 behandelt wurden. Die Reinheit der Cytosol- und N2-Fraktion wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Tubulin beziehungsweise phospho (S2)-Polymerase II nachgewiesen. Der größte Anteil von CDK6 war jeweils im

Cytoplasma nachweisbar. Die Gesamtmenge an CDK6 war jedoch bei den G1 release Zellen signifikant größer mit einem deutlich erhöhten Anteil an nukleär lokalisiertem CDK6 (Abb. 32B). Zusätzlich konnte nur bei den G1 release Zellen CDK6 auch in der Chromatinfraction detektiert werden. IL-1 zeigte bei keinem der Ansätze einen Einfluss auf die Expression oder Lokalisation von CDK6. Bei den CDK6-Knockdown-Zellen waren erwartungsgemäß bei allen Ansätzen deutlich geringere CDK6-Mengen vorhanden und bei der Chromatinfraction war selbst in den G1 release Zellen kein CDK6 nachzuweisen. Im Gegensatz zu CDK6 war bei p65 eine IL-1-induzierte zeitabhängige Translokation in die lösliche Kern- und Chromatinfraction zu erkennen. Dieser Effekt war unabhängig vom G1 release. In den CDK6-Knockdown-Zellen war diese p65 Translokation um etwa 50% verringert (Abb. 32B). Phosphoryliertes p65 war unter allen Bedingungen nur im Cytosol und in der N1 Fraktion detektierbar (Abb. 32A). Bei den CDK6-Knockdown-Zellen war im G1 release die IL-1-vermittelte Translokation von phosphoryliertem p65 verringert. c-Fos als typisches Serum-induziertes kernständiges Protein konnte nur in der N1 und N2 Fraktion detektiert werden und nahm im G1-release stark zu. Die Menge an c-Fos war IL-1-abhängig und leicht verringert bei den CDK6-Knockdown-Zellen (Abb. 32B).

4.6.2 Einfluss von 5Z-Oxo-zeaenol und SB203580 auf die CDK6-Lokalisation

Um mögliche Signalwege zu finden, die CDK6 beeinflussen, wurden HeLa-Zellen mit dem spezifischen TAK1-Inhibitor 5Z-Oxo-zeaenol oder dem spezifischen p38-MAPK-Inhibitor SB203580 behandelt. In Abbildung 33 ist zu erkennen, dass 5Z-Oxo-zeaenol sowohl die Phosphorylierung von TAK1 selbst als auch die Phosphorylierung aller durch TAK1 beeinflussten und hier untersuchten Proteine (c-Jun, p38, Hsp27) hemmte. Auch die Proteinmengen von c-Jun, c-Fos und p65 wurden durch den TAK1-Inhibitor gehemmt. Dagegen hatte dieser Inhibitor keinen Einfluss auf die Menge von CDK6, Cyclin D1 und D3. Der Inhibitor SB203580 hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Phosphorylierung seines Substrats p38 und bewirkte ausschließlich eine Hemmung der Phosphorylierung von Hsp27.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die globale G1-abhängige Umverteilung von CDK6 in den Zellkern TAK1- und p38 unabhängig ist.



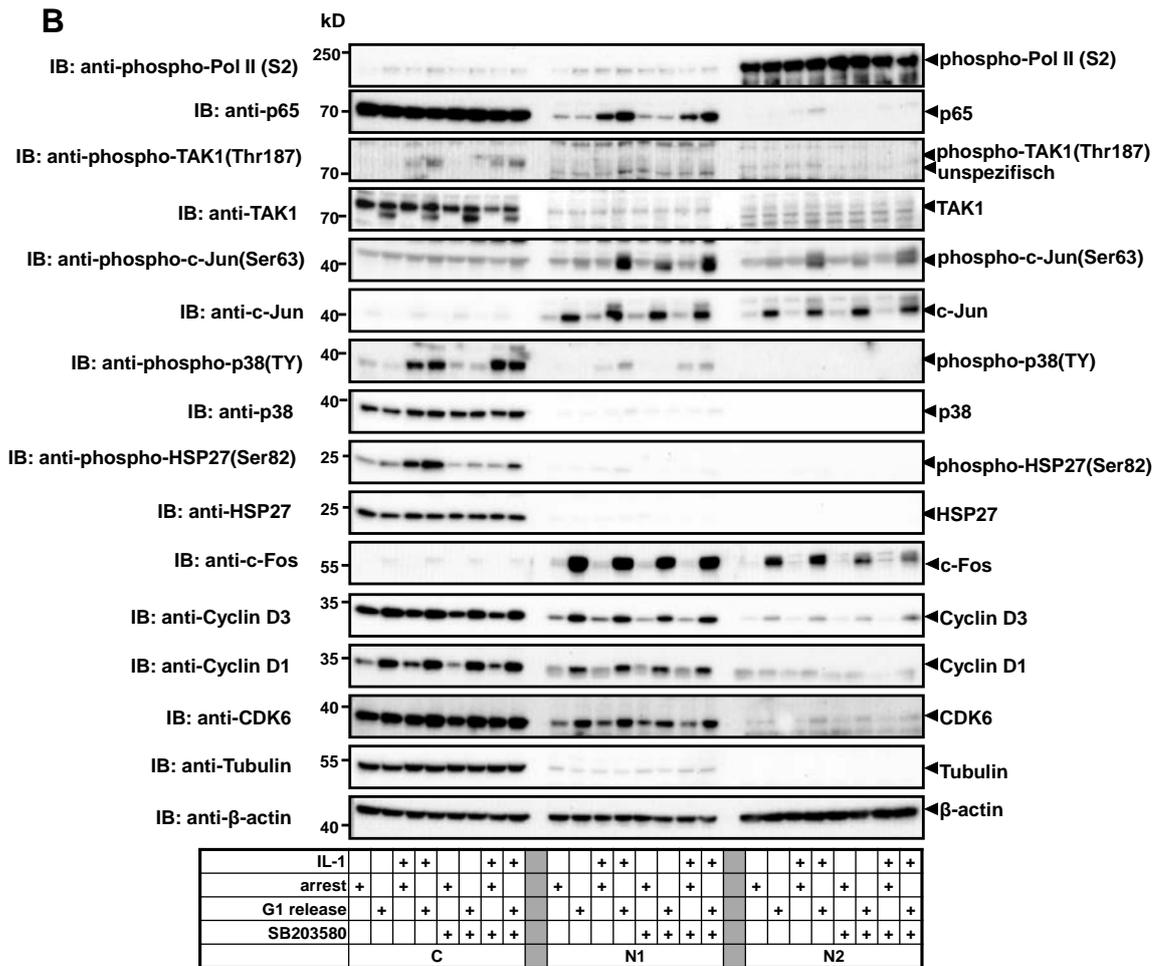


Abbildung 33: Einfluss von TAK1-Inhibitor und p38-Inhibitor auf die Expression, Phosphorylierung und Lokalisation verschiedener Proteine. HeLa-Zellen wurden wie in Abb. 13 beschrieben synchronisiert und 30 min vor der jeweiligen IL-1-Behandlung bzw. vor dem G1 release mit dem TAK1-Inhibitor 5Z-Oxo-zeaenol (1 μ M) (A) oder dem p38-Inhibitor SB203580 (2 μ M) (B) versetzt. Cytosolische- (C), lösliche nukleäre- (N1) und Chromatin-Fraktion (N2) wurden generiert und gleiche Proteinmengen mittels Western Blot analysiert. Antikörper gegen phosphorylierte RNA Polymerase II (P-S2 Pol II) und Tubulin wurden zum Nachweis der Reinheit der Fraktionen verwendet. β -actin wurde als Beladungskontrolle aller Fraktionen verwendet.

4.6.3 Chromatinbindung und Einfluss von CDK6 auf die p65-Rekrutierung

Da CDK6 auch in der Chromatinfraktion lokalisiert werden konnte und der CDK6-Knockdown die p65-Translokation beeinflusste, wurde die Rekrutierung von CDK6 an das Chromatin mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) näher untersucht. Hierzu wurde die p65- und CDK6-Bindung am Beispiel des *IL8*-Promotors näher analysiert, da *IL8* ein bekanntes p65-abhängiges inflammatorisches Gen ist und seine Expression im *CDK6*-Knockdown vermindert war (Abb. 15). Abbildung 34A zeigt, dass eine transiente Überexpression von CDK6 ohne zusätzlichen IL-1-Stimulus nicht zu einer verstärkten *IL8* mRNA-Expression führte, vergleichbar mit den zuvor gezeigten

Experimenten der aktiven CDK6-Mutante (siehe 4.1.3). Mittels ChIP konnte dagegen interessanterweise eine Bindung von CDK6 an den *IL8*-Promotor nachgewiesen werden (Abb. 34B). Die Überexpression von CDK6 führte dabei sogar zu einem erhöhten Signal, was die Spezifität des Antikörpers unterstreicht. Die Überexpression von CDK6 förderte jedoch keine p65- oder Pol II-Bindung an den *IL8*-Promotor (Abb. 34B).

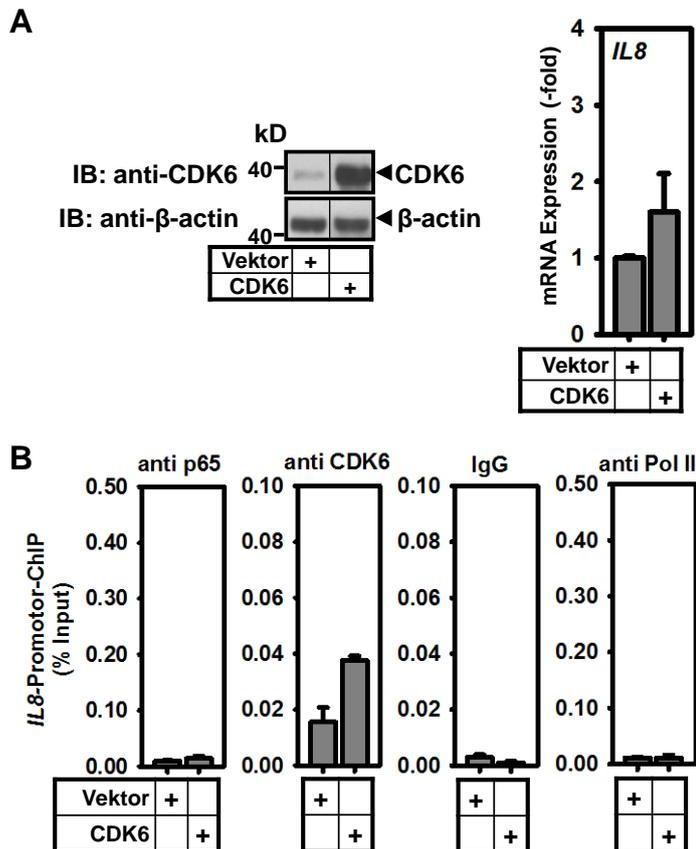


Abbildung 34: Nachweis der Chromatinbindung von überexprimiertem CDK6. HeLa-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor oder pCDNA3.1-CDK6 transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die CDK6-Expression mittels Western Blot sowie die *IL8* mRNA-Expression mittels RT-qPCR analysiert (**A**). Die ChIP wurde mit den aufgeführten Antikörpern und Primerpaaren für den *IL8*-Promotor durchgeführt. IgG-IPs wurden als Negativkontrolle verwendet (**B**). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014; ChIP-Experimente in Kooperation mit Liane Jurida).

Um den Einfluss von CDK6 auf die p65-Rekrutierung im Zellzyklus und nach IL-1-Stimulation zu untersuchen, wurden stabile HeLa pS-Kontrollzellen und HeLa-pS-shCDK6-K06-Zellen synchronisiert, mit IL-1 behandelt und deren *IL8*-Promotorbindung durch ChIP-Experimente analysiert (Abb. 35). Der G1 release ohne IL-1-Stimulus zeigte keinen Effekt auf die Bindung der untersuchten Proteine an den *IL8*-Promotor. Ein kurzer IL-1-Stimulus in arretierten Zellen führte zu einer leichten Bindung von p65 und RNA Pol II an den *IL8*-Promotor. Die Kostimulation der Zellen mit Serum und IL-1 bewirkte allerdings eine starke Rekrutierung von p65, CDK6 und RNA Pol II an den *IL8*-Promotor. Bei den

CDK6-Knockdown-Zellen waren sowohl die CDK6-Bindung an den *IL8*-Promotor als auch die IL-1-induzierte p65-Rekrutierung und somit auch die RNA Pol II-Beladung des *IL8*-Locus stark vermindert. Die nicht-regulatorische *IL8* upstream-Region diente als eine weitere Negativkontrolle. Hier war kein spezifisches Signal für die untersuchten Proteine zu erkennen.

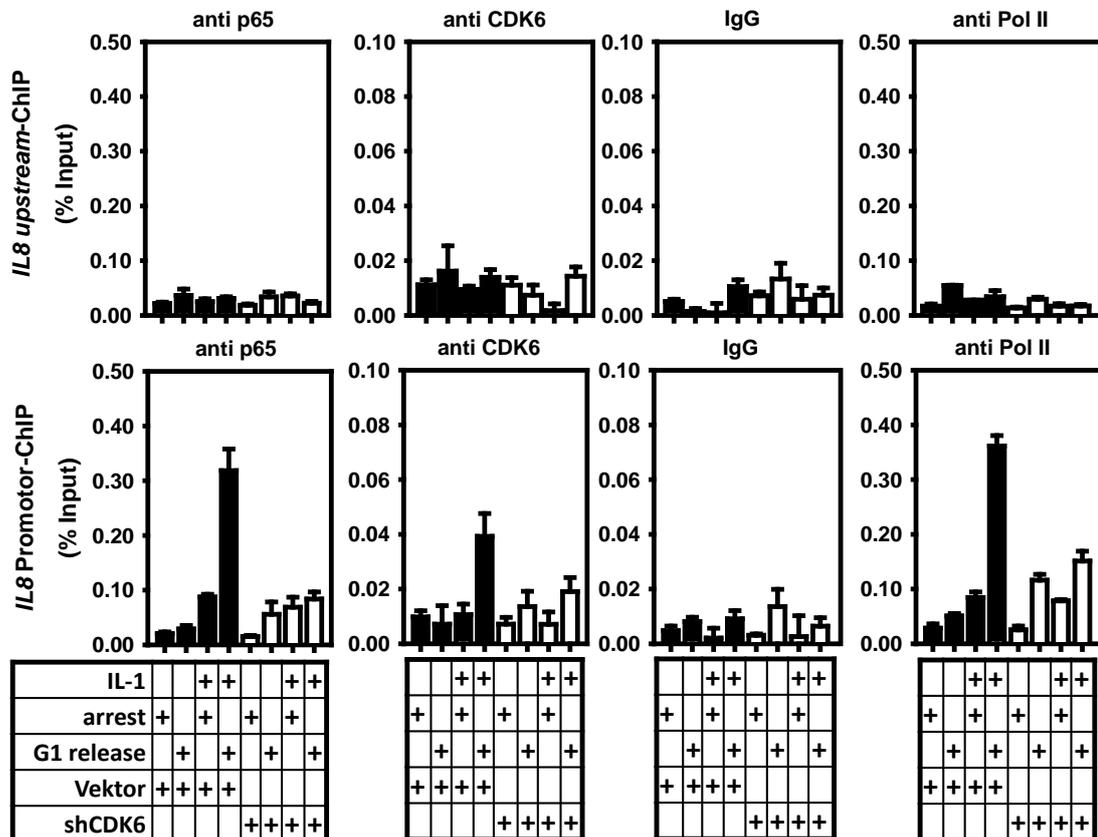


Abbildung 35: Einfluss von CDK6 auf die p65-Rekrutierung. Arretierte oder serum-stimulierte HeLa pS-Kontrollzellen (schwarze Balken) und monoklonale HeLa-pS-shCDK6-K06-Zellen (weiße Balken) wurden 30 min mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. ChIP-Analysen wurden am *IL8*-Promotor mit den dargestellten Antikörpern durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine nicht-regulatorische Region 1 kb upstream vom *IL8*-Promotor verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014; Experimente in Kooperation mit Liane Jurida)

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel sind zusammenfassend in der Abbildung 36 schematisch dargestellt. Es konnte eine regulierte nukleäre Lokalisation und Chromatinassoziation von CDK6 eindeutig nachgewiesen werden. Hierbei fördert CDK6 offenbar am Beispiel des *IL8*-Gens die Chromatinassoziation von p65.

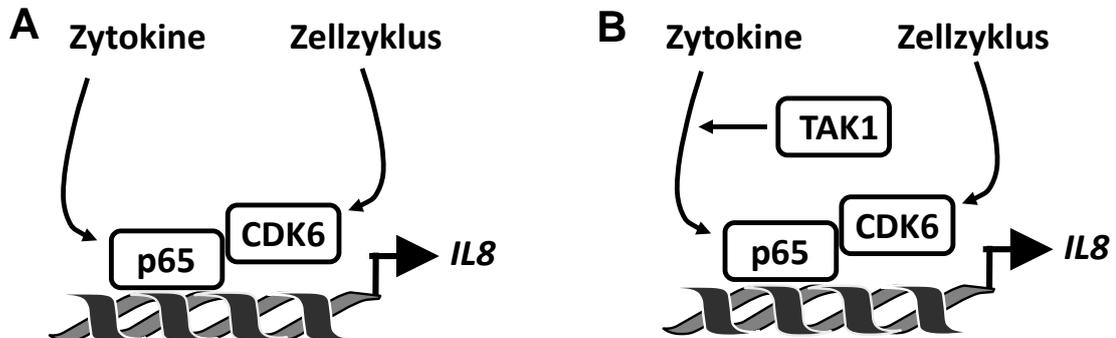


Abbildung 36: Zytokin- und Zellzyklussignale beeinflussen die Chromatinassoziation von p65 und CDK6. (A) Mittels fraktionierter Lyse konnte gezeigt werden, dass p65 IL-1-abhängig in den Kern und an das Chromatin transloziert und dieser Effekt CDK6-abhängig ist. CDK6 hingegen transloziert IL-1-unabhängig, jedoch hauptsächlich in der G1-Phase in den Kern und an das Chromatin. ChIP-Experimente zeigten, dass CDK6 und p65 gemeinsam an den *IL8*-Promotor binden. Der Knockdown von CDK6 führt dabei zu einer verminderten Bindung von p65 an den *IL8*-Promotor. (B) TAK1 beeinflusst als *upstream* Signal die Chromatinassoziation von p65, hat jedoch in synchronisierten Zellen keinen Einfluss auf die CDK6-Translokation in den Kern.

4.7 Kinase-abhängige und Kinase-unabhängige Funktionen von CDK6

Nach der Charakterisierung des Einflusses von CDK6 auf die inflammatorische Genexpression sollte in weiteren Experimenten festgestellt werden, ob diese Funktionen abhängig von der CDK6-Kinaseaktivität sind.

4.7.1 Effekt von aktiven und inaktiven CDK6-Mutanten auf die p65-Bindung und Rekrutierung an den *IL8*-Promotor

Kinase-unabhängige Funktionen wurden mit aktiven und inaktiven Mutanten von CDK6 näher untersucht. Es konnte bereits eine Koimmunopräzipitation von p65 und CDK6 wt im Überexpressionssystem nachgewiesen werden (Abb. 26A). In Abbildung 37 konnte nun auch die Bindung einer phosphorylierungsinaktiven CDK6-Mutante (CDK6 T177A) an p65 gezeigt werden.

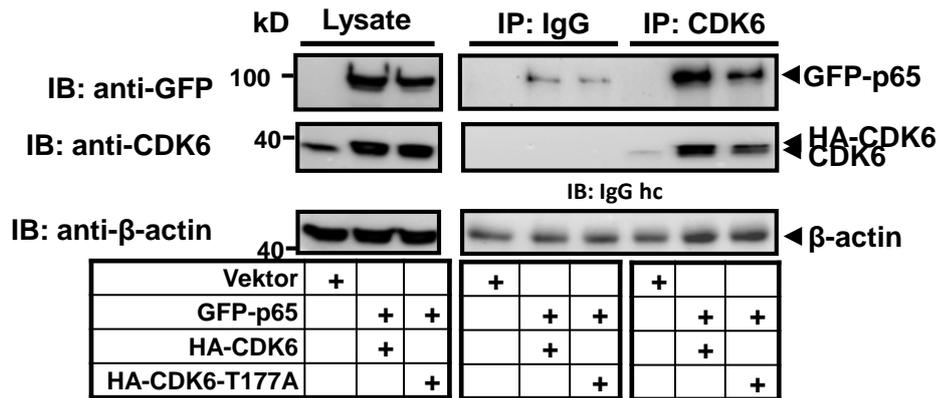


Abbildung 37: Interaktion von inaktivem CDK6 mit p65. HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Konstrukten transfiziert. Die Zellextrakte wurden für die Immunpräzipitation mit CDK6 verwendet. Eine IgG-IP wurde als Negativkontrolle verwendet. Proteine in den Lysaten und kopräzipitierte Proteine wurden mittels Western Blot analysiert (modifiziert nach Handschick et al. 2014).

Ob inaktives CDK6 einen Einfluss auf die p65-Rekrutierung an das Chromatin hat, wurde in Rekonstitutions-Experimenten getestet (Abb. 38). Die Expression von endogenem CDK6 wurde durch die transiente Transfektion einer shRNA gegen CDK6 nahezu komplett inhibiert, während gleichzeitig erfolgreich ein endogenes Expressionsniveau der entsprechenden transient transfizierten shRNA-resistenten-CDK6-Variante erreicht wurde. Die IL-1-induzierte *IL8* mRNA-Expression blieb ebenso wie die Rekrutierung von p65 an den *IL8*-Promotor von der CDK6-Kinaseaktivität unbeeinflusst (Abb. 38).

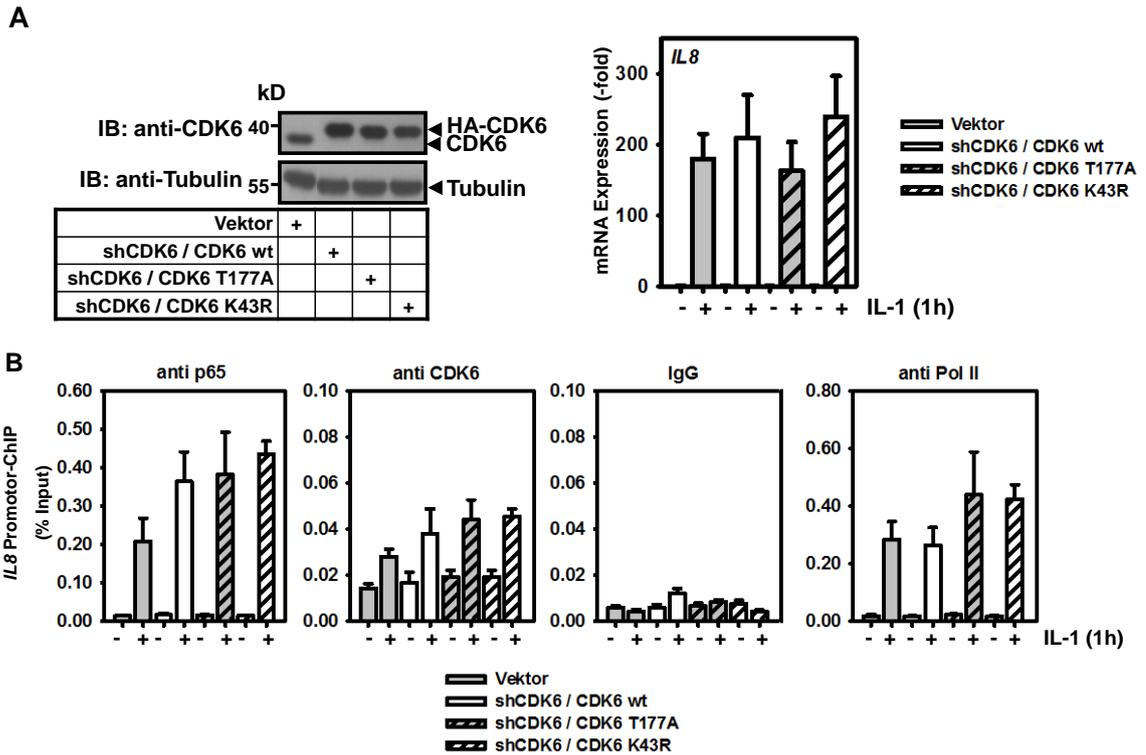


Abbildung 38: Keine Veränderung der p65-Rekrutierung an das Chromatin durch rekonstituiertes aktives oder inaktives CDK6. (A) HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Konstrukten transient transfiziert und 48 h mit Puromycin selektiert. Die Zellen wurden für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) stimuliert, lysiert und die CDK6-Expression mittels Western Blot und die *IL8* mRNA-Expression mittels RT-qPCR analysiert. **(B)** Die ChIP wurde mit den dargestellten Antikörper und Primerpaaren für den *IL8*-Promotor aus unter (A) beschriebenen Zellen durchgeführt. IgG wurde als Negativkontrolle verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- s.e.m. von vier unabhängigen Experimenten (ChIP-Experimente in Kooperation mit Johanna Soelch).

4.7.2 Hemmung der IL-1-induzierten *IL8*-Expression in weiteren *CDK6*-Knockdown Zelllinien

Um auszuschließen, dass der *CDK6*-Effekt auf die *IL8* mRNA-Expression nur in HeLa-Zellen auftritt, wurde der *CDK6*-Knockdown auch in anderen Zelltypen durchgeführt und untersucht. Die mit HeLas verwandten Epithelkarzinom-KB-Zellen, humane MRC5 Fibroblasten und die Glioblastomlinien G55 und U251 wurden transient mit der shRNA gegen *CDK6* (pSP-shCDK6) transfiziert. In diesen verwendeten Zelllinien führte ein *CDK6*-Knockdown zu einer Hemmung der IL-1-induzierten *IL8* mRNA-Expression (Abb. 39).

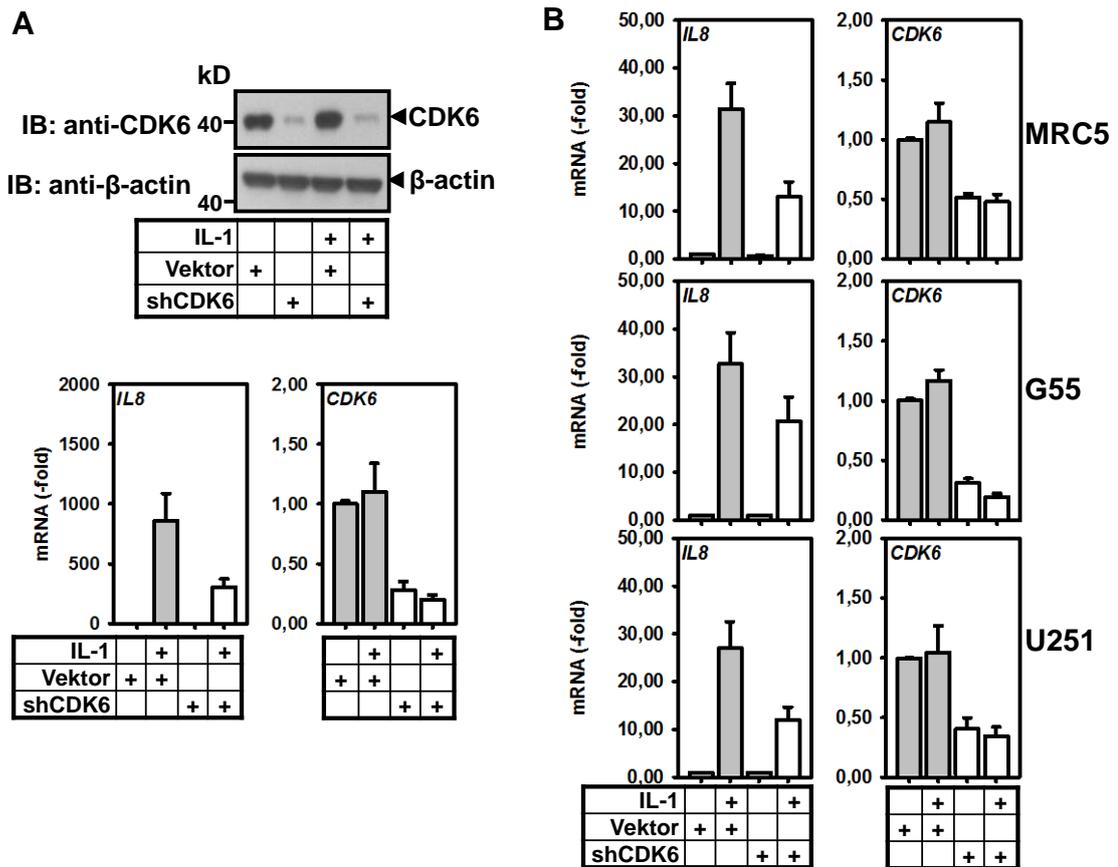


Abbildung 39: Einfluss des CDK6-Knockdowns auf die IL-1-induzierte Genexpression in weiteren Zelllinien. (A) KB Zellen wurden mittels Lipofectamin mit einem Kontrollplasmid (Vektor) oder shRNA gegen *CDK6* (pSP-shCDK6) transfiziert. Nach einer Selektion von 4 Tagen mit Puromycin wurden die Zellen mit IL-1 (10 ng/ml) für 1 h behandelt. Die *CDK6*-Expression wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Die *IL8* und *CDK6* mRNA-Expression wurde durch RT-qPCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. von drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Das gleiche Experiment wie in (A) durchgeführt in humanen MRC5 Fibroblasten und Glioblastomalinien G55 und U251. Die Analyse der *IL8* und *CDK6* mRNA-Expression wurde wie in (A) oder mittels *cells-to-ct-Kit* (MRC5) durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. von drei (MRC5) oder vier (G55, U251) unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

4.7.3 Einfluss des Knockdowns von CDK7 und Cyclinen

Um festzustellen, ob neben CDK6 auch andere CDKs oder Cycline einen Einfluss auf die IL-1-induzierte *IL8* mRNA-Expression und die Rekrutierung von p65 bzw. CDK6 haben, wurden neben CDK4 die unmittelbar stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Regulatoren des G1-CDK6 Signalweges untersucht. Dazu wurden CDK7 als Komponente des CAK-Komplexes sowie die Cycline D1 und D3, welche für die Aktivierung von CDK6 und 4 eine funktionelle Rolle spielen (siehe 1.2) mittels shRNA-Konstrukten supprimiert. In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass CDK4, CDK7, Cyclin D3 und Cyclin D1 konstitutiv oder zellzyklus-induziert im Nukleus detektiert wurden. Cyclin D1 zeigte dabei nur ein schwaches Signal in der Chromatinfraction.

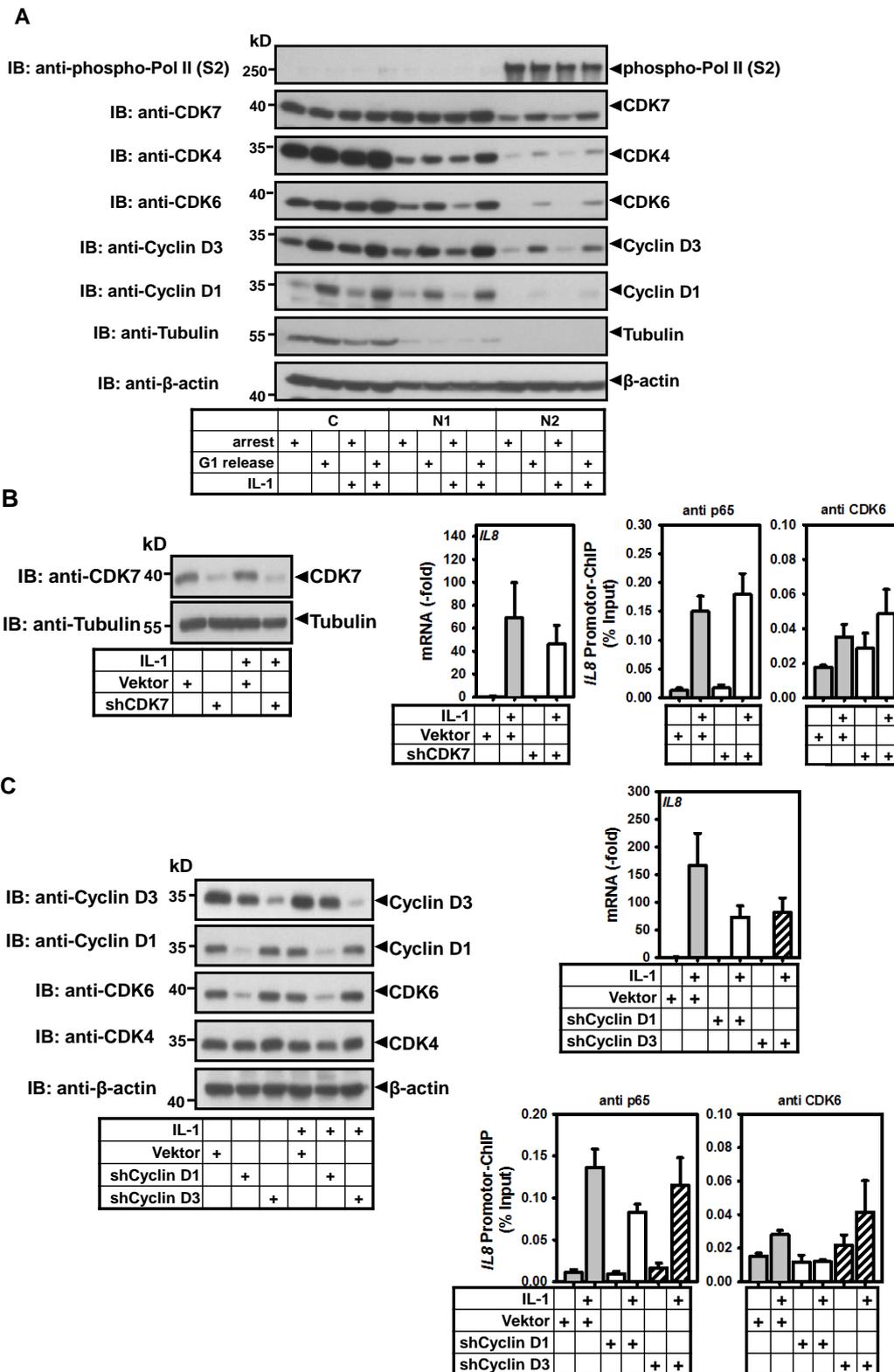


Abbildung 40: Einfluss von *CDK7*, *Cyclin D1*- und *Cyclin D3*-Knockdown. (A) Stabil transfizierte HeLa pS-Zellen wurden wie in Abb. 13A beschrieben synchronisiert und mit IL-1 stimuliert. Eine fraktionierte Lyse wurde wie beschrieben durchgeführt, um Proteine mittels Western Blot zu detektieren. (B, C) HeLa-Zellen wurden transient mit Vektoren kodierend für shRNAs gegen *CDK7* (B) oder *Cyclin D1* und *Cyclin D3* (C) transfiziert. Nach 48 h Puromycinselektion wurde die Zellen für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Die Effizienz des Knockdown wurde mittels Western Blot analysiert. Die *IL8* mRNA-Expression und p65- sowie CDK6-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor wurde wie beschrieben analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014; ChIP-Experiment in Kooperation mit Johanna Soelch und Liane Jurida)

Wie bereits unter 4.3.2 gezeigt, hat der *CDK4*-Knockdown einen inhibierenden Effekt auf die IL-1-induzierte *IL8* mRNA-Expression. Eine Hemmung von *Cyclin D1* und *D3* führte ebenfalls zu einer Reduktion der *IL8* mRNA-Expression (Abb. 40C), jedoch nur sehr schwach beim *CDK7*-Knockdown (Abb. 40B). Nur der Knockdown von *Cyclin D1* hat Einfluss auf die CDK6-Expression und beeinträchtigt die p65- und CDK6-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor (Abb. 40C).

Insgesamt zeigen diese Versuche eine zusätzliche Evidenz für eine Rolle des G1-Signalweges in der Regulation inflammatorischer Gene.

In ChIP-Experimenten konnte keine Rekrutierung von Cyclin D1, D3, CDK4 (Handschiek et al. 2014) sowie von CDK7 (Daten nicht gezeigt) an den *IL8*-Promotor nachgewiesen werden. Somit sind wahrscheinlich weitere Kofaktoren für die CDK6-abhängige IL-1-induzierte inflammatorische Genexpression notwendig (siehe schematische Abbildung 41).

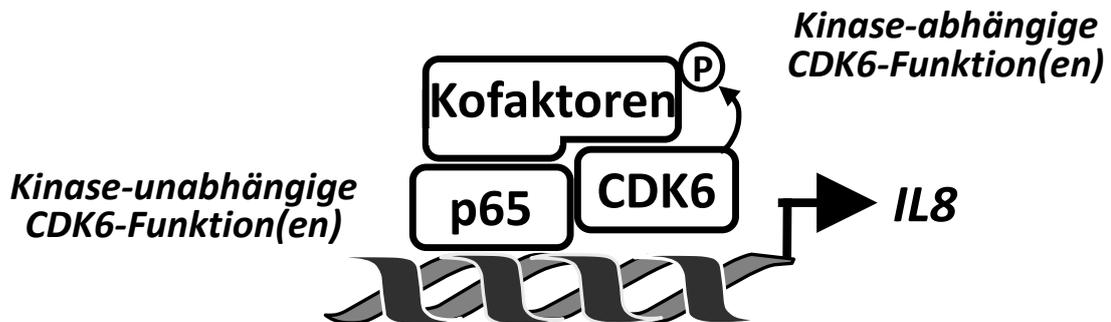


Abbildung 41: Kinase-abhängige und Kinase-unabhängige Funktionen von CDK6. Durchgeführte ChIP-Experimente zeigen, dass die CDK6-abhängige Interaktion mit p65 und die Regulation der p65-Chromatinassoziation unabhängig von der CDK6-Kinaseaktivität erfolgen kann. Die Beeinflussung der *IL8*-Genaktivität dagegen erfordert die CDK6-Kinaseaktivität, vermutlich über die direkte oder indirekte Phosphorylierung von weiteren für die produktive Transkription erforderlichen Kofaktoren.

4.8 Identifikation von neuen Interaktionspartnern und putativen CDK6 Substraten

Um die Rolle von CDK6 für die inflammatorische Genexpression besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit somit auch nach neuen Interaktionspartnern/Substraten von CDK6 gesucht.

4.8.1 Suche nach neuen Interaktionspartnern von CDK6 mittels Y2H-Screen

Für die Identifizierung direkter Interaktionspartner von CDK6, wurde die konstitutiv aktive Mutante CDK6 S178P für mehrere Y2H-Screens ausgewählt. Der dafür notwendige Vektor wurde wie unter 3.1.17 beschrieben generiert und der Screen wurde von der *Genomics & Proteomics Core Facility* (Dr. Frank Schwarz, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Die ermittelten putativen

Interaktionspartner sind in Tabelle 14 dargestellt. Die beiden Proteine p18 und p19 sind bereits gut charakterisierte CDK6-Interaktionspartner (Guan et al. 1996, Noh et al. 1999), während weder GFM1 noch Cyclin I (CCNI) bisher im Zusammenhang mit einer CDK6-Interaktion beschrieben wurden.

Tabelle 14: Im Y2H-Screen identifizierte Interaktionspartner

"Bait"	"Prey"	Häufigkeit des isolierten Fragments	Beschreibung	Gen ID
CDK6	CDKN2D	82	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2D (p19)	1032
CDK6	CDKN2C	44	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2C (p18)	1031
CDK6	GFM1	3	G Elongationsfaktor, mitochondrial 1	85476
CDK6	CCNI	2	Cyclin I	10983

Um die gewonnenen Informationen aus dem Y2H-Screen mit einer unabhängigen Methode zu validieren, wurden Koimmunpräzitationen durchgeführt. Wie in Abbildung 42A dargestellt, konnten die Inhibitoren p18 und p19 sehr gut koimmunpräzipitiert werden. Eine Bindung von Cyclin I an CDK6 mittels GFP-Immunpräzitation konnte gezeigt werden (Abb. 42B), während die Interaktion von CDK6 mit GFM1 nicht bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

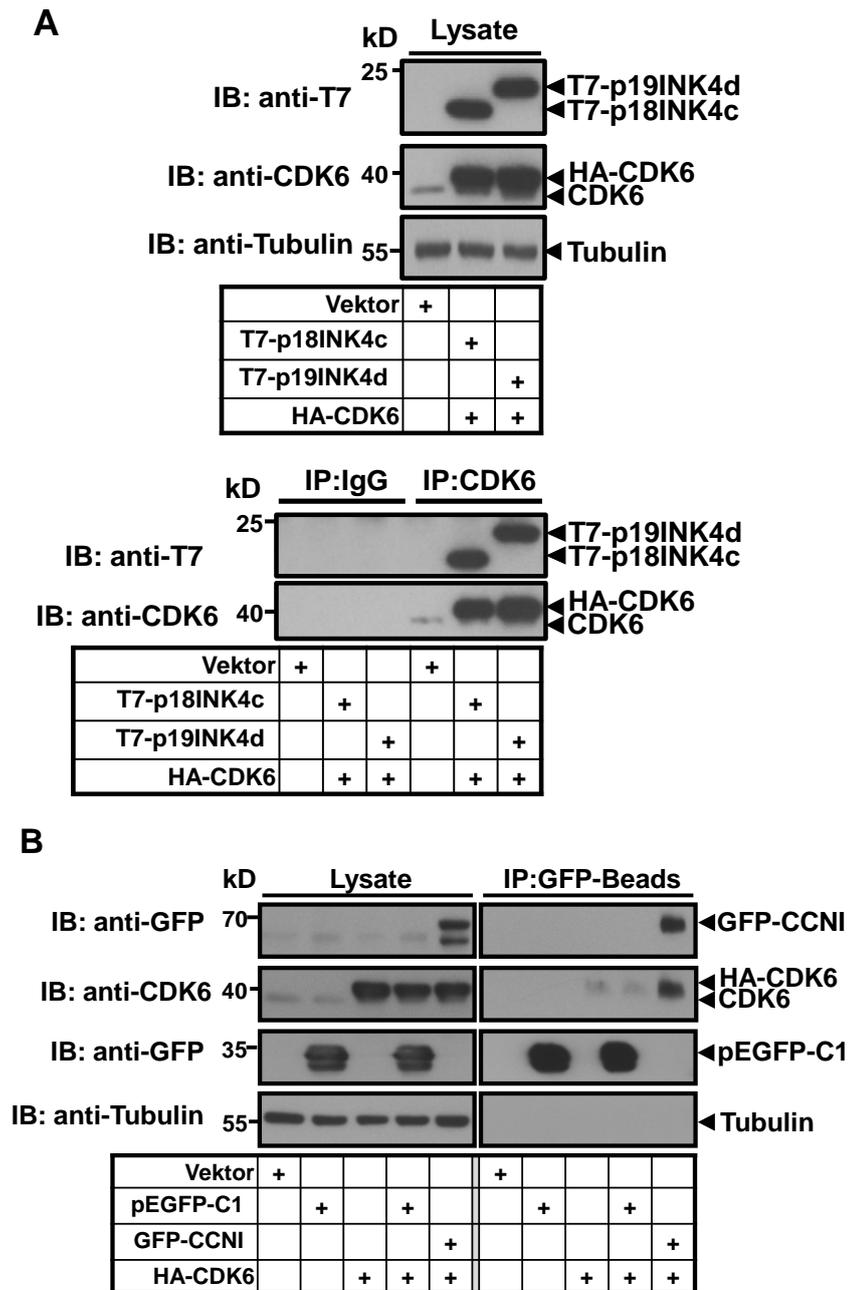


Abbildung 42: Validierung des Y2H-Screens. HeLa-Zellen wurden für mit den dargestellten Konstrukten transfiziert, lysiert und die Proteine wurden mittels Western Blot nachgewiesen. Die Lysate wurden für eine CDK6, IgG (A) oder GFP (B) Immunpräzipitation verwendet. Koimmunpräzipitierte Proteine wurden mit den dargestellten Antikörpern nachgewiesen.

4.8.2 TRIP6 als mögliches neues CDK6 Substrat

Neben dem Y2H-Screen wurde auch die Methode des KinomeView (Service von *Cell Signaling Technology*; siehe 3.1.18) für die Identifikation neuer CDK6 Substrate eingesetzt. Dieser Western Blot Service gibt zunächst einen allgemeinen Überblick über die zellulären Phosphorylierungen von Substraten bestimmter Kinasen. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, gab es einige durch IL-1 induzierte Phosphorylierungen von Proteinen in synchronisierten HeLa-pS-Kontrollzellen und HeLa-pS-shCDK6-K06-Zellen. Jedoch waren die

vorhandenen Unterschiede auch in Bezug auf den *CDK6*-Knockdown sehr gering bzw. dieser Assay nicht sensitiv genug, um die Unterschiede zu detektieren. Deshalb wurde mit dem im KinomeView eingesetzten *CDK*-Antikörper zusätzlich ein Phospho-Scan durchgeführt, welcher gegen die Konsensussequenz der Phosphorylierungsstelle von *CDK* Substraten gerichtet ist und Aufschluss über die Menge und Art der phosphorylierten Substrate gibt (Abb. 44) (siehe 3.1.19).

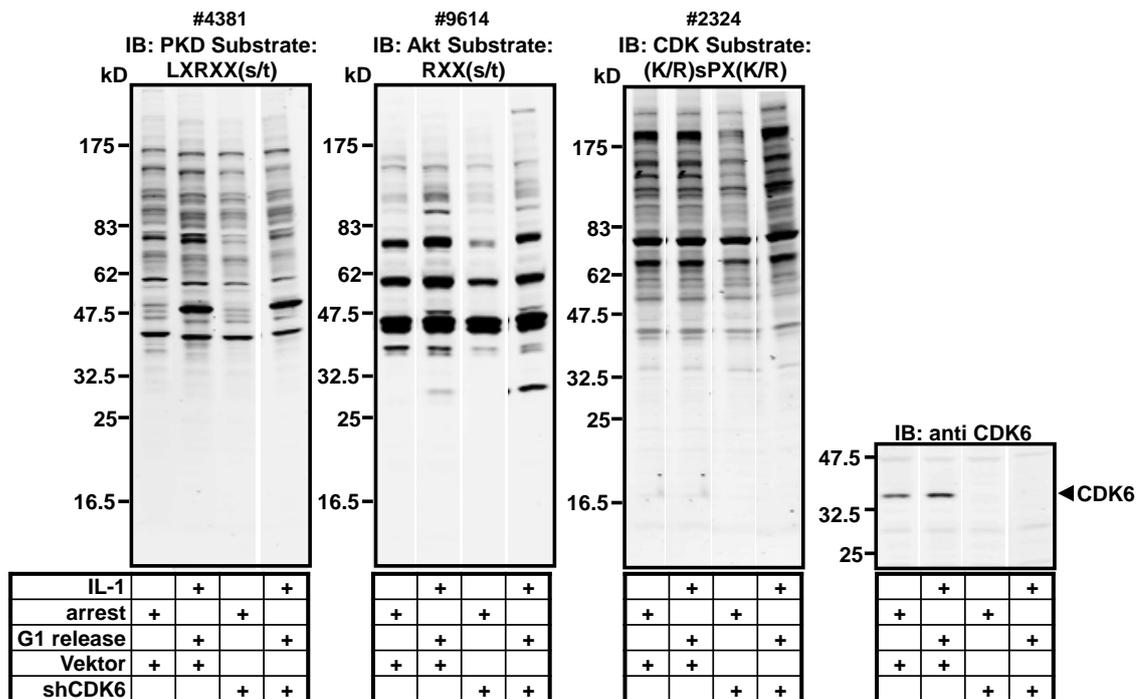


Abbildung 43: Western Blot Analysen im KinomeView. Stabil transfizierte HeLa pSuper-Puro- (Vektor) und shCDK6-Knockdown (shCDK6)-Zellen wurden wie in Abb. 13A beschrieben synchronisiert und 30 min mit IL-1 stimuliert. Zelllysate wurden mit spezifischen Substrat-Antikörpern mittels Western Blot analysiert. Der Knockdown wurde parallel mit einem *CDK6*-Antikörper nachgewiesen.

Durch die Massenspektrometrie immunpräzipitierter Proteine wurden 124 Peptide gefunden, deren Phosphorylierung mindestens 1,9fach in *CDK6*-Knockdown-Zellen verändert war (Tabelle 15, Anhang). Darunter waren unter anderem auch Peptide, die die bekannten Phosphorylierungsstellen Ser608 und Ser612 des Rb-Proteins enthalten (Zarkowska et al. 1997, Schmitz et al. 2006, Burke et al. 2012) (Abb. 44A). Alle Peptide enthielten mindestens ein phosphoryliertes Serin oder Threonin gefolgt von einem Prolin (minimales *CDK* Phosphorylierungsmotiv) (Errico et al. 2010). 70 der 124 putativen *CDK6*-Substrate waren bekannte nukleäre Proteine. Das am stärksten herunterregulierte Peptid in *CDK6*-Knockdown-Zellen war TRIP6 (*thyroid receptor-interacting protein 6*) (Abb. 44A). Die Phosphorylierung von TRIP6 wurde durch den G1 release plus IL-1 induziert und war bei den *CDK6*-Knockdown-Zellen zehnfach geringer. Die verringerte Phosphorylierung von

TRIP6 bei den CDK6-Knockdown-Zellen ist in Abbildung 44B durch das HPLC Profil verdeutlicht.

A

Peptid	x-fache Veränderungen in Peptidmenge (Ratios)			Genname	phosphorylierte Aminosäuren	Peptide
	arrest (shCDK6) / Vektor	G1 release + IL-1 / Vektor	G1 release + IL-1 (shCDK6) / Vektor			
1	-5,95	3,51	-10,85	TRIP6	135, 147	TGS*LKPNPASPLPAS* S TYGGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
2	-5,95	3,51	-10,85	TRIP6	135, 153	TGS*LKPNPASPLPASPYGGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
3	-5,95	3,51	-10,85	TRIP6	142, 147	TGSLKPNPAS* S PLPAS* S TYGGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
4	-5,95	3,51	-10,85	TRIP6	142, 149	TGSLKPNPAS* S PLPASPY* S GGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
5	-5,95	3,51	-10,85	TRIP6	142, 153	TGSLKPNPAS* S PLPASPYGGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
6	-5,95	3,51	-10,85	TRIP6	142, 156	TGSLKPNPAS* S PLPASPYGGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
7	-5,31	-1,20	-9,48	TRIP6	149	TGSLKPNPASPLPASPY* S GGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
8	-5,31	-1,20	-9,48	TRIP6	153	TGSLKPNPASPLPASPYGGPTPASYTTASTPAGPAFFVQVK
9	-	1,36	-5,12	RB1	606, 612	EGPTDHLSEACPLNLPQNNHTAADMIY* L SPVRS* T K
10	-	1,36	-5,12	RB1	608, 612	EGPTDHLSEACPLNLPQNNHTAADMIY* L SPVRS* T K

* Phosphorylierungsstelle
S*, CDK Phosphorylierungsstellen
S*, bekannte CDK4/6 Phosphorylierungsstellen im RB Protein

B

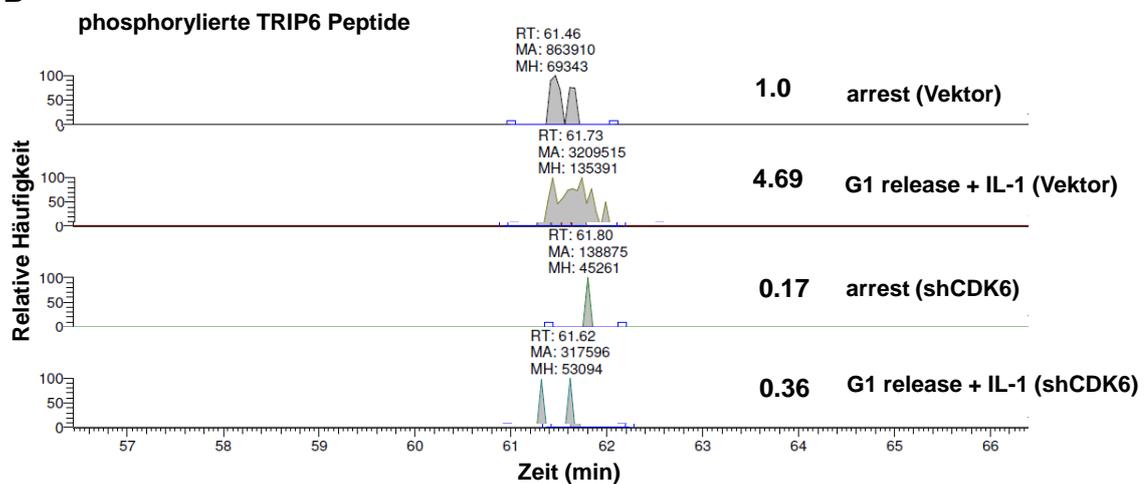


Abbildung 44: TRIP6 als mögliches neues CDK6 Substrat. (A) Gezeigt sind die durch LC/MS/MS identifizierte phosphorylierte TRIP6 und Retinoblastomprotein (RB) Peptide wie im Methodenteil unter 3.1.19 beschrieben. Dargestellt ist die relative Häufigkeit von TRIP6 und RB Peptiden und die Aminosäuresequenz der Phosphopeptide. Sterne kennzeichnen die Phosphorylierungsstellen (modifiziert nach Handschick et al. 2014). **(B)** HPLC Profil der phosphorylierten TRIP6 Peptide. Die Fläche unter den Peaks wurde quantifiziert, um die Ratio Verhältnisse der Peptide unter den verschiedenen Bedingungen im Zellextrakt zu ermitteln.

Die Ergebnisse des Phospho-Scans wurden durch eine Vielzahl an Experimenten überprüft. Zunächst wurde die Phosphorylierung von TRIP6 durch CDK6 mittels *in vitro* Kinaseassays untersucht (Abb. 45). Jedoch konnte nach einer Immunpräzipitation von CDK6 in synchronisierten Kontroll- und CDK6-Knockdown-Zellen kein Unterschied in der Phosphorylierung von TRIP6 festgestellt werden (Abb. 45A). Auch durchgeführte *in vitro* Kinaseassays mit Lysaten, die aktives CDK6 überexprimieren, führten zu keiner Phosphorylierung des verwendeten rekombinanten TRIP6 Proteins (Abb. 45B).

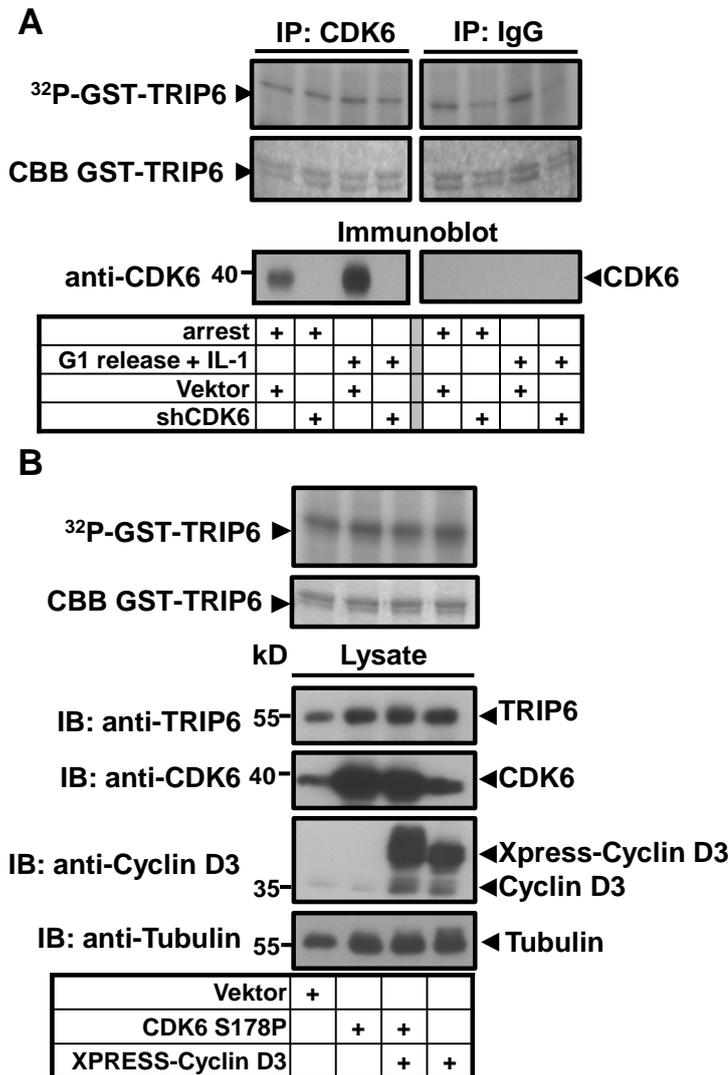


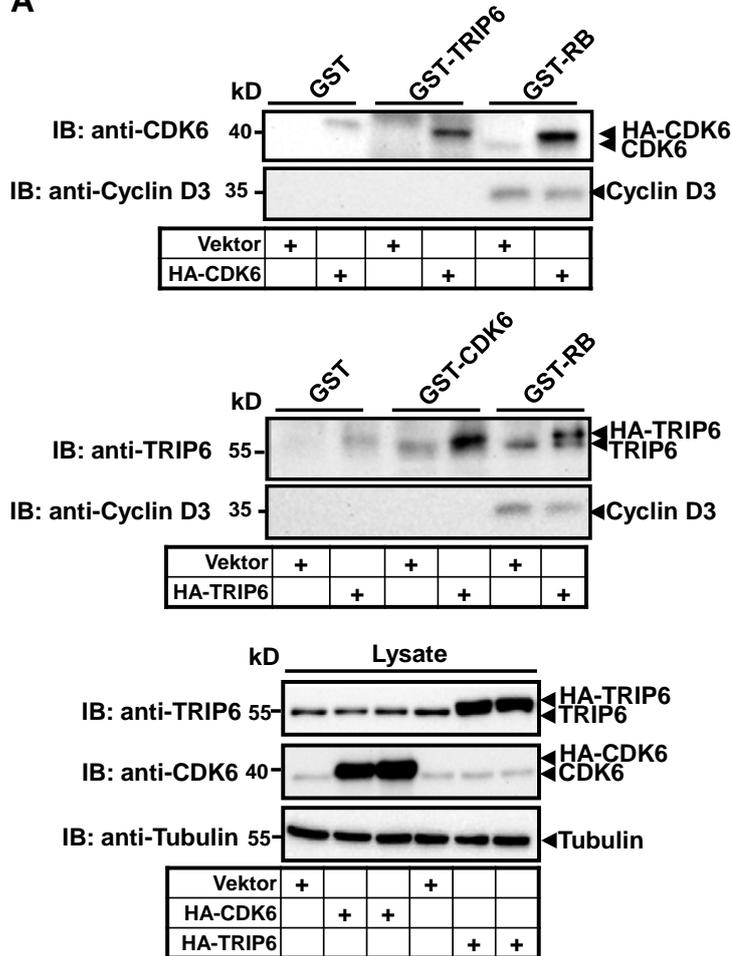
Abbildung 45: Phosphorylierung von TRIP6 durch CDK6. (A) HeLa Kontrollzellen (Vektor) und CDK6-Knockdown-Zellen (shCDK6) wurden wie dargestellt synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, CDK6 immunpräzipitiert und die Aktivität von CDK6 durch *in vitro* Kinaseassay mit GST-TRIP6 und 32 P-ATP als Substrat nachgewiesen. Parallel dazu wurden Aliquots des Immunkomplexes im Western Blot getestet. **(B)** HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Konstrukten transient transfiziert. Lysate wurden im Western Blot und im Kinaseassay analysiert. CBB: Coomassie Brilliant Blue

4.8.3 Interaktion von TRIP6 mit CDK6 und p65

Für den Nachweis einer möglichen Interaktion von TRIP6 mit CDK6 und p65 wurden GST-pulldown-Assays durchgeführt. In Abbildung 46A ist zu erkennen, dass eine Bindung von überexprimiertem CDK6 an TRIP6 nachgewiesen wurde. Ebenso konnte die Bindung von überexprimiertem TRIP6 an GST-gekoppeltes CDK6 nachgewiesen werden. Ein Nachweis der endogenen Bindung war nicht möglich, während eine Interaktion von Rb sowohl mit TRIP6 als auch mit CDK6 zu beobachten war. Zusätzlich konnte mittels PLA die endogene Interaktion von TRIP6 mit CDK6 und auch p65 gezeigt werden (Abb.

46B, C). Die Menge des Protein-Protein-Komplexes war, im Gegensatz zu der CDK6 und p65 Interaktion (Abb. 28, Abb. 46 C), IL-1-unabhängig. Die Interaktion zwischen TRIP6 und p65 bzw. TRIP6 und CDK6 fand zu 80% im Cytosol statt (Abb. 46B).

A



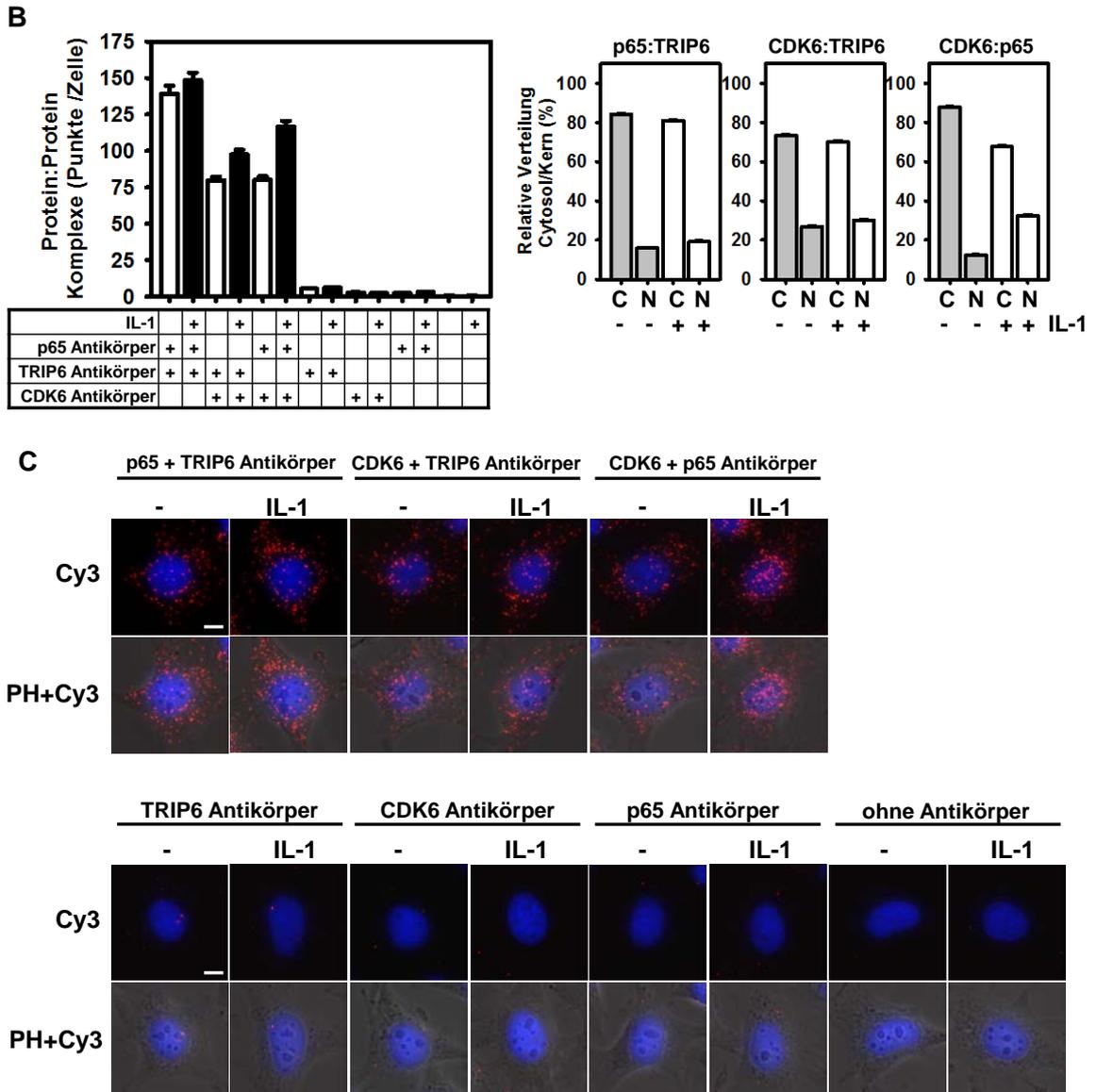


Abbildung 46: Interaktion von TRIP6 mit CDK6 und p65. (A) HeLa-Zellen wurden mit HA-CDK6 oder HA-TRIP6 transient transfiziert. Zelllysate wurden mit rekombinanten Proteinen wie dargestellt kombiniert und der GST-Pulldown-Assay wurde wie beschrieben durchgeführt (siehe 3.3.7). Lysate und Protein:Protein-Interaktionen wurden mittels Western Blot analysiert. (B) HeLa-Zellen wurden mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) für 1h stimuliert. Antikörper gegen TRIP6, p65 und CDK6 wurden verwendet, um intrazelluläre Interaktionen mittels PLA zu detektieren. In der linken Grafik sind die gezählten positiven Fluoreszenzsignale von mindestens 50 Zellen als Mittelwert pro Zelle +/- s.e.m. dargestellt. Die rechte Grafik zeigt die relative Verteilung von Fluoreszenzsignalen vor und nach IL-1-Behandlung im Cytosol (C) und Kern (N). (C) Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen des in (B) erläuterten PLA Versuches. Außerdem sind repräsentative Bilder von Negativkontrollen (ohne Antikörper oder nur mit einem Antikörper) dargestellt. Balken: 10µm. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

4.8.4 Koaktivierende Funktion von TRIP6

Um die Rolle von TRIP6 in CDK6-Knockdown-Zellen näher zu untersuchen, wurden p65 und TRIP6 in Kontrollzellen und CDK6-Knockdown-Zellen überexprimiert. Die Überexpression von p65 allein führte in den Kontrollzellen zu einem deutlichen Anstieg der *IL8* mRNA-Expression (Abb. 47), welcher sich verstärkte, wenn zusätzlich eine Überexpression von TRIP6 stattfand. In CDK6-

Knockdown-Zellen führte weder p65 allein noch zusammen mit TRIP6 zu einem Anstieg der *IL8* mRNA-Expression. Die Proteinexpression von p65 und TRIP6 wurde jeweils an das entsprechende endogene Expressionniveau angepasst.

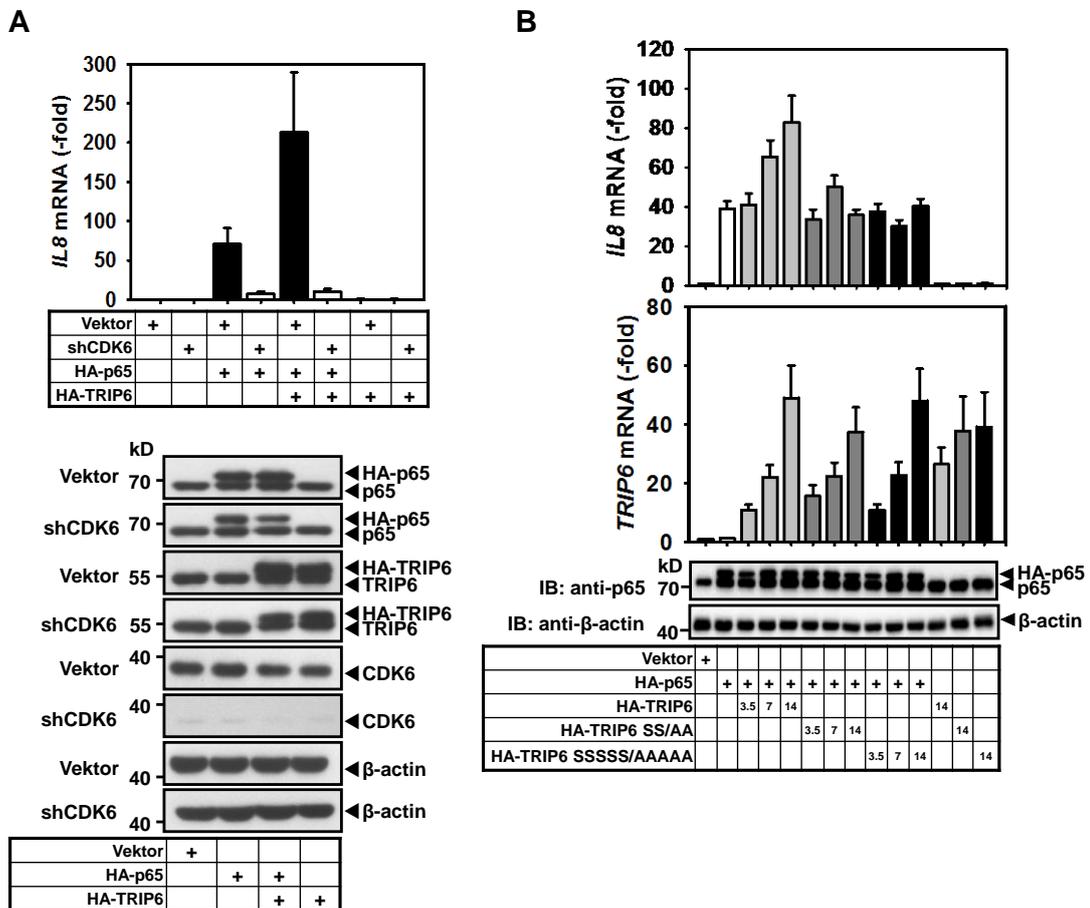


Abbildung 47: Koaktivierende Funktion von TRIP6. (A) HeLa Kontrollzellen (Vektor) und CDK6-Knockdown-Zellen (shCDK6) wurden mit den aufgeführten Konstrukten transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Expression der Konstrukte mittels Western Blot und die *IL8* mRNA-Expression mittels RT-qPCR analysiert. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von drei unabhängigen Experimenten. Gleichzeitig wurden die Zellextrakte mittels Western Blot analysiert. (B) HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Konstrukten in aufsteigender Konzentration transient transfiziert. Nach 24 h wurde die *IL8* mRNA-Expression mittels RT-qPCR ermittelt. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von fünf unabhängigen Experimenten. Gleichzeitig wurden Zellextrakte auf gleichmäßige p65-Expression mittels Western Blot analysiert. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

Die koaktivierende Funktion von TRIP6 auf die p65-vermittelte Expression von *IL8* nahm konzentrationsabhängig zu (Abb. 47B). Dieser Effekt konnte mit *TRIP6*-Mutanten, in denen zwei CDK6 Phosphorylierungsstellen (Ser142, Ser147) zu Alanin mutiert wurden, aufgehoben werden (Abb. 47B). Auch die Mutation aller im Phospho-Scan gefundenen *TRIP6* Phosphorylierungsstellen (Ser135, Ser142, Ser147, Thr153, Ser156) zu Alanin blockierte die *TRIP6*-abhängige Verstärkung der p65-induzierten *IL8*-Transkription (Abb. 47B).

4.8.5 Einfluss eines TRIP6-Knockdowns auf die *IL8* mRNA-Expression und die p65-Rekrutierung

Da die Überexpression von TRIP6 aktivierend auf *IL8* zu wirken schien, stellte sich die Frage, ob ein *TRIP6*-Knockdown den gegenteiligen Effekt hat. In Abbildung 48A ist der shRNA-vermittelte *TRIP6*-Knockdown dargestellt. Dieser zeigte sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene eine über 90%ige Hemmung von TRIP6. Die *CDK6* mRNA-Menge und die CDK6-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor blieben unbeeinflusst. Jedoch führte ein transienter *TRIP6*-Knockdown zu einer verminderten IL-1-induzierten *IL8* mRNA-Expression (Abb. 48A) und p65-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor (Abb. 48B).

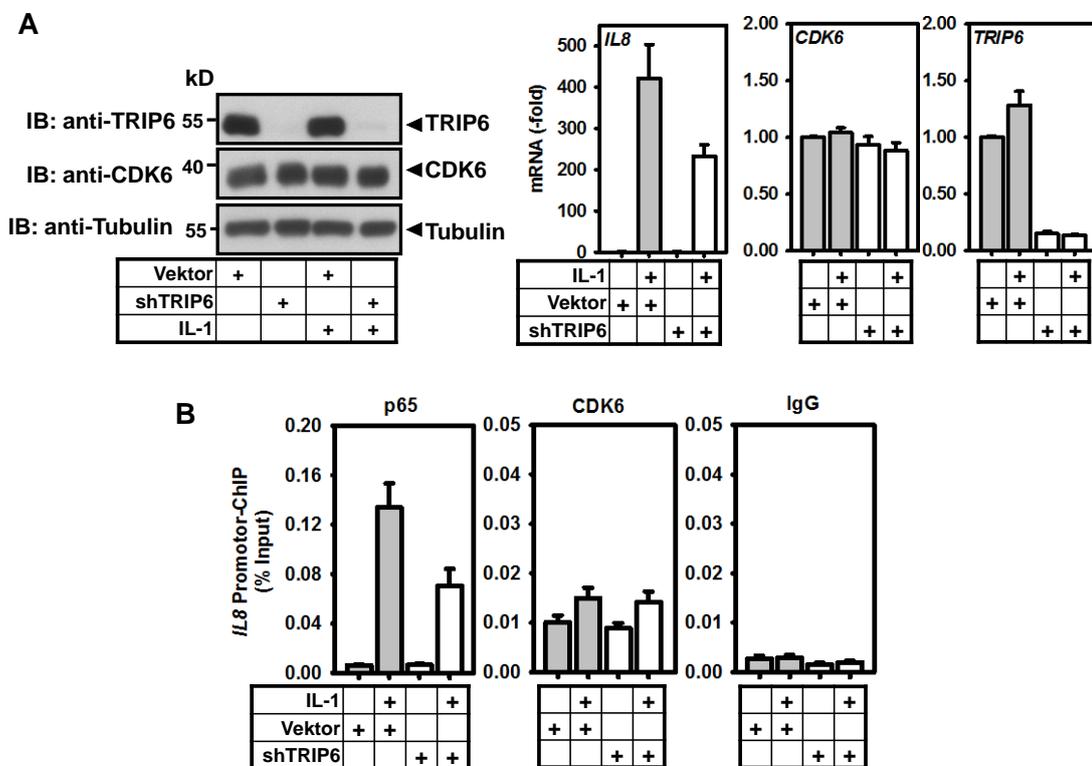


Abbildung 48: Einfluss des *TRIP6*-Knockdowns auf die *IL8* mRNA-Expression und die p65-Rekrutierung. HeLa-Zellen wurden mit einem Vektor kodierend für shRNA gegen *TRIP6* transient transfiziert. Nach 48 h Puromycinselktion wurden die Zellen für 1 h mit/ohne IL-1 (10 ng/ml) inkubiert. Die Effizienz des Knockdowns wurde mittels Western Blot (A) analysiert. Die *IL8* mRNA-Expression (A) sowie die p65- und CDK6-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor (B) wurden wie beschrieben analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- s.e.m. von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014; ChIP-Experimente in Kooperation mit Johanna Soelch und Liane Jurida)

Zusammenfassend konnte herausgefunden werden, dass TRIP6 sehr wahrscheinlich ein direktes oder indirektes CDK6 Substrat ist. TRIP6 interagiert und kolokalisiert sowohl mit p65 als auch CDK6 und übt eine koaktivierende Funktion auf die p65-vermittelte *IL8*-Expression aus. Experimente mit einem TRIP6-Knockdown validieren diese Befunde. Die koaktivierende Funktion von TRIP6 wird durch die CDK6-abhängige Phosphorylierung verstärkt (schematisch dargestellt in Abb. 49).

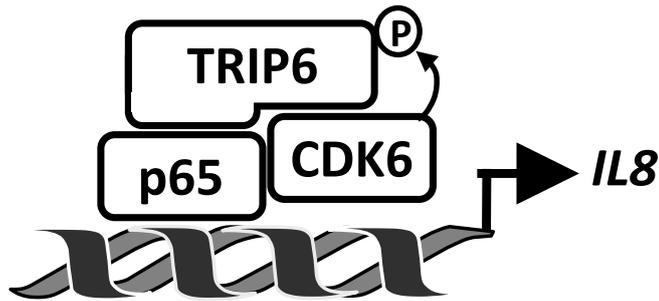


Abbildung 49: Die TRIP6-Koaktivatorfunktion wird durch CDK6-abhängige Phosphorylierung verstärkt. TRIP6 wurde als neues Substrat von CDK6 identifiziert. Sowohl eine Interaktion von TRIP6 mit CDK6 und p65 als auch eine CDK6-abhängige koaktivierende Funktion auf die p65-vermittelte Genexpression konnte nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Die zytokinregulierte inflammatorische Genantwort wird durch eine Vielzahl von Mechanismen (z.B. *feed-forward* oder *feedback loops*) (ko)reguliert, welche die sehr schnelle und starke Genexpression unterstützen oder wieder abschwächen (Weber et al. 2010, Schmitz et al. 2011). Neben vielen anderen Transkriptionsfaktoren spielt vor allem NF- κ B eine zentrale Rolle in der Regulation von Genen, die an Entzündungsprozessen und der Tumorentwicklung beteiligt sind (Hayden and Ghosh 2008, Baud and Karin 2009). Die regulatorischen *feed-forward loops* sind dabei notwendig, um die Immunantwort auf molekularer Ebene zu beschleunigen und so z.B. dem Wachstum von pathogenen Mikroorganismen im Rahmen einer Infektion entgegenzuwirken (Schmitz et al. 2011). Für den effizienten und schnellen Anstieg der inflammatorischen Antwort durch *feed-forward loops* gibt es zahlreiche Beispiele. So induzieren viele inflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF α die Expression ihrer eigenen Gene, wodurch die autokrine NF- κ B Aktivierung und Amplifikation des pro-inflammatorischen Signalweges unterstützt wird (Covert et al. 2005). Ein anderes Beispiel ist die IL-1-induzierte Sekretion von IL-8, welches über Chemokinrezeptoren sowohl G-Protein gekoppelte Signalwege und Chemotaxis als auch über eine Phosphorylierung von I κ B α die NF- κ B- Aktivierung induziert (Manna and Ramesh 2005).

Regulierte posttranslationale Modifikationen von NF- κ B spielen für dessen Aktivität ebenfalls eine entscheidende Rolle (Wietek and O'Neill 2007). Für die p65-Untereinheit von NF- κ B-Komplexen ist zum Beispiel eine Regulation durch verschiedene Proteinkinasen nachgewiesen (Buss et al. 2004, Schmitz et al. 2004). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CDK6 ebenfalls die NF- κ B Untereinheit p65 phosphoryliert. Diese Ergebnisse ließen eine bisher unbekannte Verbindung zwischen zwei zellulären Regulationsmechanismen vermuten. Hierbei handelt es sich um die Kontrolle der Zellproliferation durch CDKs und um die inflammatorische Genantwort mit NF- κ B als zentralem Faktor. Um den Einfluss von CDK6 auf die inflammatorische Genexpression funktionell und mechanistisch näher untersuchen zu können, wurden deshalb Zellkulturmodelle generiert, in denen die CDK6-Menge und/oder die CDK6-Aktivität gezielt manipuliert werden konnte.

5.1 Verstärkte inflammatorische Genexpression im *gain-of-function*-Modell der CDK6 Kinase

Zunächst wurde der zellzyklusunabhängige Einfluss einer konstitutiv aktiven überexprimierten CDK6-Mutante auf die inflammatorische Genexpression untersucht. Hierbei wurde die CDK6 S178P-Mutante verwendet.

Um vollständig aktiv zu sein, muss CDK6 im Komplex mit einem D-Typ Cyclin vorliegen und am Thr 177 phosphoryliert werden (Kaldis et al. 1998, Bockstaele et al. 2009). Die letztendlich aktivierende Phosphorylierung erfolgt durch den konstitutiv aktiven CAK-Komplex (Fisher 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Glioblastoma-Zelllinien der endogene Cyclin D3-CDK6-Komplex, im Gegensatz zum Cyclin D3/D1-CDK4-Komplex, nur schwach phosphoryliert vorliegt und nicht durch Serumzugabe stimulierbar ist (Bockstaele et al. 2006). Wird jedoch bei CDK6 das Serin an Stelle 178 zu einem Prolin mutiert und dadurch die Phosphorylierungsstelle von CDK4 imitiert, erhöht sich die CDK6-Aktivität stark, da CDK6 nun Cyclin-unabhängig an T177 phosphoryliert werden kann (Bockstaele et al. 2009). Durch die Experimente mit CDK6 S178P, welche keine natürlich vorkommende Mutation ist, aber zu einer CDK4-ähnlichen Konformationsänderung und damit Aktivierung in CDK6 führt, konnte ein eindeutiger Einfluss von CDK6 auf inflammatorische Gene festgestellt werden (Abb. 8, 9). Die Mutante verstärkte dabei die mRNA-Expression von *IL8* und *IL6*. Da dieser Effekt jedoch ausschließlich in IL-1-stimulierten Zellen beobachtet wurde, war zu vermuten, dass für die Wirkung von CDK6 zuvor ein essentieller Faktor wie z.B. die NF- κ B-Untereinheit p65 aktiviert werden muss.

Durch die Messung der CDK6-Effekte in einzelnen Zellen mittels LMD konnte auch gezeigt werden, dass die CDK6 S178P-Mutante nicht über parakrine oder indirekte Effekte die IL-1-induzierte Genexpression verstärkt, sondern dass der CDK6-abhängige Signalweg in genau der Zelle, welche die Kinasemutante überexprimiert, aktiv ist (Abb. 9).

Die IL-1-induzierte *IL8* und *IL6* mRNA-Expression wurde durch den CDK4/6 Inhibitor PD332991 komplett blockiert (Abb. 8). Da unter diesen Bedingungen neben dem konstitutiv aktiven CDK6 auch die endogen vorhandenen CDK4/CDK6 Kinasen inhibiert werden, lässt sich schlussfolgern, dass neben CDK6 auch CDK4 für eine inflammatorische Genantwort notwendig ist. Es war daher wichtig, in weiteren Experimenten diese Vermutung durch andere experimentelle Ansätze zu stützen.

5.2 Korrelation der CDK6-Aktivität und der zellzyklus-abhängigen Genexpression

Da weder die Aktivität des endogenen CDK6 noch der aktiven Mutante durch einen IL-1-Stimulus beeinflusst wurden, ist es unwahrscheinlich, dass Proteine des inflammatorischen Signalwegs Regulatoren von CDK6 darstellen (Abb. 11, 12). Diese Annahme wird durch *in vitro* Kinaseassays mit synchronisierten Zellen gestützt, bei denen die in der Literatur beschriebene G1-abhängige CDK6-Aktivität reproduziert, aber keine IL-1-Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte (Abb. 12).

Mit Hilfe von Microarray-Experimenten, die das komplette bekannte humane Transkriptom abdecken, konnte der generelle Einfluss des Zellzyklus auf inflammatorische Gene genauer betrachtet werden (Abb. 13B-D). Ein beträchtlicher Teil der dabei gefundenen IL-1-abhängigen Gene wurde auch durch einen G1-release induziert (11 von 29). Dieser Befund suggerierte eine enge Koppelung von Zellzyklus und Entzündungsregulation. Unter diesen Genen fanden sich u.a. auch die hinsichtlich ihrer entzündungsregulierenden Funktionen gut charakterisierten Zytokine *IL6*, *IL8*, *CXCL1* und *CCL20* (Baud and Karin 2009). Darüber hinaus zeigte die quantitative Analyse der entsprechenden Microarraydaten, dass der G1 release einen verstärkenden Effekt auf die Induktion IL-1-abhängiger Gene hatte (Abb. 13E). Aufgrund der vorherigen Befunde kam CDK6 als ein möglicher Regulator der G1 vermittelten inflammatorischen Genexpression in Frage. Im Folgenden wurde daher versucht, diese Hypothese unter physiologischeren Bedingungen als sie das CDK6 S178P Überexpressionsmodell darstellte, zu überprüfen.

5.3 Identifikation von endogenem CDK6 als Kofaktor für die Expression inflammatorischer Gene

Um physiologischere Bedingungen für die Folgeexperimente zu schaffen, wurden Zelllinien generiert, die dauerhaft eine sehr starke RNAi-vermittelte Suppression der CDK6-Menge bei unveränderter CDK4-Expression zeigten. Da CDK6 ausschließlich während der G1-Phase phosphoryliert wird und damit enzymatisch aktiv ist (Meyerson and Harlow 1994) und unter der Annahme, dass diese Phosphorylierung entscheidend für den Einfluss auf die inflammatorische Genexpression ist, wurden die Zellen in einem großen Teil der Versuche synchronisiert. Bei gehemmter *CDK6*-Expression ist die IL-1-induzierte Genantwort in G1 stark vermindert (Abb. 15). Diese Beobachtung deckt sich mit den CDK4/6-Inhibitor-Experimenten in nicht synchronisierten Zellen (Abb. 8). Experimente mit G1 arretierten Zellen, die in die S-Phase entlassen wurden, zeigen keine CDK6-abhängigen Effekte auf die

inflammatorische Genexpression (Handschick et al. 2014). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die inflammatorische Genexpression während der G1-Phase von einem Signalweg beeinflusst wird, an dem CDK6 beteiligt ist. Die Verwendung von Fucci-Zellen mit einem stabilen *CDK6*-Knockdown ermöglichte die detaillierte Charakterisierung des Einflusses einzelner Zellzyklusphasen und von CDK6 auf die Expression inflammatorischer Gene. Durch die Isolation von Zellen aus einem definierten Zellzyklusstadium mittels Laser-Mikrodissektion war es möglich, die Abhängigkeit der CDK6-Effekte von der G1-Phase eindeutig zu zeigen und damit die vorherigen Experimente zu bestätigen (Abb. 23). Besonders auffällig war die sehr niedrige Expression inflammatorischer Gene bei Zellen in der G0/frühen G1-Phase (Abb. 23). Für die Zytokine *IL8* und *IL6* ist eine niedrige Expression in unsynchronisierten, unstimulierten Zellen bereits geschildert. Diese Expression konnte dabei jedoch durch IL-1 oder TNF α schnell und stark induziert werden (Krause et al. 1998, Vanden Berghe et al. 2000, Hoffmann et al. 2002).

Da HeLa-CDK6-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen keine verringerte Zellproliferation aufwiesen und CDK6-Knockdown-Fucci-Zellen und entsprechende Kontrollzellen eine vergleichbare Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen zeigten, wurde CDK6 als notwendiger Faktor für die Zellproliferation ausgeschlossen (Abb. 21D). Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden aus der Literatur (Malumbres et al. 2004).

Sowohl die FACS-Analyse synchronisierter HeLa-Zellen (Abb. 12) als auch die mikroskopische Analyse der Fucci-Zellen (Abb. 21D) zeigten, dass die Synchronisation durch Serumentzug nicht vollständig ist. Der Serumentzug ist der Arretierung durch Zellzyklusinhibitoren aufgrund der geringen Stressbelastung jedoch vorzuziehen und bietet deshalb einen physiologischeren Ansatz, da auch in Tumoren eine vollständige Synchronisierung aller Zellen als unwahrscheinlich anzusehen ist.

5.4 Beteiligung weiterer CDKs und Cycline an der inflammatorischen Genexpression

CDK6 und CDK4 zeigen eine hohe Sequenzhomologie und haben viele Gemeinsamkeiten in der Assoziation mit Cyclinen und Cyclininhibitoren bei der Regulierung des Rb-Signalweges (Ortega et al. 2002). Die klassische Rolle von CDK4 und CDK6 im G1/S-Zellzyklusübergang als alleinige Funktion der Kinasen wurde angezweifelt, als gezeigt werden konnte, dass isolierte Deletionen der *Cdk4*- oder *Cdk6*-Gene zu lebensfähigen Tieren führen und dass aus doppel-defizienten Mäusen isolierte embryonale Fibroblasten noch proliferieren können (Malumbres et al. 2004, Santamaria et al. 2007). Um zu

testen, inwieweit beide Kinasen überlappende oder distinkte zellzyklusunabhängige Funktionen in den in dieser Dissertation verwendeten Zelllinien haben, wurden vergleichende genomweite Microarray-Studien mit CDK6- und CDK4-Knockdown-Zellen durchgeführt (Abb. 19).

Diese Daten zeigen, dass die Kinasen neben ihrer Rolle im Zellzyklus, Funktionen als Koregulatoren von inflammatorischen Genen in IL-1-induzierten G1 release-Zellen haben. Durch die geringe Überlappung aller beeinflussten Gene wird jedoch deutlich, dass beide Kinasen auch voneinander unabhängige regulatorische Funktionen ausüben (Abb. 19). Es ist bereits durch andere Untersuchungen belegt, dass neben den Gemeinsamkeiten auch Unterschiede zwischen den Kinasen bestehen. Die vom CAK-Komplex genutzte Phosphorylierungsstelle unterscheidet sich zwischen CDK6 (T177) und CDK4 (T172). Bei einer CDK4-Mutante, die durch CAK nicht mehr phosphoryliert werden kann, konnte dennoch eine CDK4-Aktivität nachgewiesen werden (Bockstaele et al. 2009). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit der phosphorylierungsinaktiven CDK6-Mutante (CDK6 T177A) zeigten hingegen keinerlei enzymatische Aktivität mehr (Abb. 11). Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass die Kinasen in Komplexen mit jeweils verschiedenen Cyclinen assoziieren (Bates et al. 1994, Grossel and Hinds 2006).

Fraktionierte Lyse-Experimente ergaben, dass beide Proteine Chromatin-assoziiert vorkommen (Abb. 40). Dies unterstützt die Annahme, dass CDK6 und CDK4 zellzyklusunabhängige Funktionen in der transkriptionellen Genregulation haben. Während CDK6 jedoch durch ChIP-Experimente am *IL8*-Promotor konzentrationsabhängig nachgewiesen wurde (Abb. 34), konnte eine signifikante CDK4-Rekrutierung an die Chromatinregion des *IL8* Gens nicht gemessen werden (Handschick et al. 2014). Weitere Experimente mit CDK4 ChIP-Seq-Analysen müssen zeigen, wo die genomischen Rekrutierungsorte von CDK4 liegen. Die erhobenen Daten am *IL8*-Locus geben aber einen eindeutigen Hinweis darauf, dass CDK4 und CDK6 nicht die gleiche regulatorische Rolle im molekularen Mechanismus der Genexpression haben.

Das für die Aktivierung aller am Zellzyklus beteiligten CDKs verantwortliche und im CAK-Komplex vorliegende CDK7 könnte ebenfalls eine Rolle in der Regulation der inflammatorischen Genexpression spielen. CDK7 zeigt dabei unterschiedliche Präferenzen bei der Phosphorylierung der verschiedenen CDKs. CDK6 ist zum Beispiel ein besseres Substrat des CAK-Komplexes als CDK4 (Kaldis et al. 1998, Bockstaele et al. 2006, Bockstaele et al. 2009). Neben den zellzyklusrelevanten Funktionen, ist CDK7 außerdem ein Teil des Transkriptionsfaktors TFIIF und phosphoryliert die für die Aktivierung notwendige C-terminale Domäne der RNA Pol II im Rahmen der

Transkriptionselongation (Fisher 2005). In der Literatur sind widersprüchliche Angaben zur Aktivität und Lokalisation von CDK7 zu finden. So wurde mehrfach beschrieben, dass CDK7 weder vom Zellzyklus noch von mitogenen Stimuli abhängig ist (Matsuoka et al. 1994, Tassan et al. 1994, Paternot et al. 2009). Jedoch konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die CDK7-Phosphorylierung durch Mitogene in der G1-Phase erhöht ist (Schachter et al. 2013). Durch fraktionierte Lyse-Experimente konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die Expression von CDK7 in der G1-Phase erhöht ist, wobei CDK7 sowohl im Cytosol als auch im Kern vorhanden ist und die Expression durch einen IL-1-Stimulus nicht beeinflusst wird (Abb. 40A). Knockdown-Experimente von CDK7 zeigten einen schwachen Einfluss auf die IL-1-induzierte *IL8* mRNA-Expression, aber keine Wirkung auf die Rekrutierung von p65 an den *IL8*-Promotor (Abb. 40B). Diese Kinase ist deshalb sehr wahrscheinlich nicht direkt an der transkriptionellen Regulation der inflammatorischen Genexpression beteiligt. Mit den für die CDK6-Aktivität wichtigen Cyclinen D1 und D3 wurden ebenfalls Knockdown-Experimente durchgeführt (Abb. 40C). Die Verringerung der Cyclin D3-Expression führte zu einer verminderten *IL8*-Expression bei unveränderter p65-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor. Ähnlich wie CDK7, scheint Cyclin D3 damit keinen direkten Einfluss auf die Rekrutierungsfunktion von CDK6 zu haben. Eine verminderte Cyclin D1-Menge führt hingegen zu einer Reduktion der zellulären CDK6-Menge und hemmt dabei die p65- und CDK6-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor (Abb. 40C). Es ist denkbar, dass CDK6 in der Abwesenheit von Cyclin D1 instabiler wird, daher lassen diese Daten keine eindeutigen Aussagen über die Rolle von Cyclin D1 auf Chromatinebene zu. Allerdings validieren diese in einem unabhängigen Knockdown-Experiment erhobenen Befunde die grundsätzliche Beobachtung dieser Arbeit, dass Zellzyklusfaktoren und der G1-Signalweg einen Einfluss auf die IL-1-induzierte Chromatinrekrutierung von p65 und die davon abhängige mRNA-Regulation von *IL8* haben.

5.5 Mechanismus der Transkriptionsregulation durch CDK6:p65-Interaktionen

Da gezeigt werden konnte, dass die stark transaktivierende p65-Untereinheit durch CDK6 an Ser536 phosphoryliert wird (Abb. 30) und CDK6 am p65-abhängigen *IL8*-Promotor nachgewiesen werden konnte (Abb. 34, 35), sollte der Charakter dieser Interaktion genauer untersucht werden.

Durch die Koimmunopräzipitation von p65 mit CDK6 nach fraktionierter Lyse transfizierter Zellen, wurde festgestellt, dass die Interaktion beider Proteine vorrangig in der biochemisch separierbaren Chromatinfraction stattfindet (Abb.

26A). Diese Ergebnisse passen zu der hauptsächlich im Zellkern nachgewiesenen Kolo­kalisierung beider Proteine bei transfizierten Zellen, die p65 überexprimieren (Abb. 26B). Betrachtet man die Kolo­kalisierung der Interaktionspartner auf endogener Ebene, ist eine IL-1-Abhängigkeit der Kolo­kalisierung im Kern feststellbar (Abb. 27A). Aufgrund der hohen p65-Konzentrationen bei Überexpressionsexperimenten, ist ein zusätzlicher IL-1-Stimulus für die Kernkolo­kalisierung wahrscheinlich nicht mehr notwendig. Um die mit endogener Expression gefundenen Ergebnisse bestätigen zu können, wurde der Interaktionsnachweis zusätzlich mit dem hochsensitiven und spezifischen PLA-Assay durchgeführt (Abb. 28). Hierbei konnte auch ohne IL-1-Stimulus eine geringe kernständige Kolo­kalisierung detektiert werden, die sich aber durch IL-1 deutlich verstärkte. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die distinkten vor allem in nukleären Domänen vorkommenden CDK6:p65 Komplexe abhängig von der IL-1-abhängigen p65-Translokation in den Kern sind. Dort interagiert CDK6 mit p65, um die Expression inflammatorischer Gene zu verstärken. Dieser molekulare Mechanismus würde erklären, warum bei Überexpression der konstitutiv aktiven CDK6-Mutante nur dann eine verstärkte inflammatorische Genexpression zu beobachten war, wenn zusätzlich ein IL-1-Stimulus gegeben wurde (Abb. 8). Zusätzlich wurde durch fraktionierter Lyse festgestellt, dass bei einem *CDK6*-Knockdown die Menge an Kern-lokalisier­tem und Chromatin-assoziiertem p65 nach IL-1-Stimulus stark verringert ist (Abb. 32). Vermutlich fördert die CDK6-Bindung die stabile p65-Rekrutierung an die Promotoren inflammatorischer Gene. Die CDK6-abhängige Kernlokalisierung von p65 wäre durch eine CDK6-vermittelte Retention von p65 im Kern erklärbar. Eine durch CDK6-vermittelte Phosphorylierung von p65 im Kern könnte auch zur verstärkten Chromatinassoziation beitragen. Wie schon bekannt ist, kann die Serin-536 Phosphorylierung im Cytoplasma und im Kern detektiert werden (Abb. 32) (Mattioli et al. 2004). Unklar ist, ob dies auf den dynamischen Kernimport/-export von phosphoryliertem p65 zurückzuführen ist oder ob cytosolische und nukleäre Serin 536 Proteinkinasen vorhanden sind. Deshalb wäre eine CDK6-vermittelte cytosolische Phosphorylierung und die daraus resultierende p65-Translokalisierung in den Zellkern eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die CDK6-Abhängigkeit der p65-Kernlokalisierung. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine Reihe an Proteinkinasen p65 an Ser-536 (Sakurai et al. 1999) phosphorylieren und diese Phosphorylierung an der Regulierung des nukleären Imports von p65 beteiligt ist (Hu et al. 2005, Mattioli et al. 2006). Die p65-Ser-536-Phosphorylierung reguliert außerdem die Interaktion mit Korepressoren und -aktivatoren die zur erhöhten Transaktivierung von Genen wie *IL8* beitragen (Buss et al. 2004).

Experimente mit synchronisierten Zellen, in denen die IL-1-vermittelte p65-Ser-536-Phosphorylierung beim *CDK6*-Knockdown verringert ist, stützen die Annahme, dass der beobachtete Einfluss von *CDK6* auf p65 phosphorylierungsabhängig ist (Abb. 30). Die verbleibende messbare p65-Ser-536-Phosphorylierung bei diesen Experimenten kann auf die Aktivität anderer p65 Kinasen, wie *IKK α / β* zurückgeführt werden. Neben der verringerten p65-Phosphorylierung wurde beim *CDK6*-Knockdown auch eine verminderte p65-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor festgestellt (Abb. 35). Möglicherweise ist die verringerte Phosphorylierung dafür verantwortlich. Eine Überexpression von *CDK6* führt jedoch nicht zu einer verstärkten Bindung von p65 an den *IL8*-Promotor, was die Notwendigkeit weiterer Faktoren für die p65-Rekrutierung vermuten lässt (Abb. 34). Überraschenderweise zeigt eine phosphorylierungs-inaktive Mutante (*CDK6* T177A) keine veränderte Bindung an p65 (Abb. 37) und führt zu einer dem Wildtyp vergleichbarer Rekrutierung von p65 an den *IL8*-Promotor (Abb. 38). Die katalytisch inaktive *CDK6*-Mutante K43R zeigte ebenfalls keine verminderte p65-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor (Abb. 38). Auf der Grundlage dieser Experimente kann sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierung und die Kinaseaktivität von *CDK6* einen Einfluss auf die Bindung an p65 oder Rekrutierung von p65 an den *IL8*-Promotor hat. Hier lässt sich ein ähnlicher Mechanismus vermuten wie bei Versuchen an Mäusen, bei denen *CDK6* eine kinaseunabhängige regulatorische Funktion beim Tumorsuppressor p16^{INK4a} ausübt (Kollmann et al. 2013).

Mit der Hilfe von Reporterexperimenten sollte die genaue transaktivierende Wirkung von *CDK6* auf p65 untersucht werden. Hierbei wurde keinerlei transaktivierende Wirkung des *CDK6*-Wildtyps, aber eine schwache Wirkung der konstitutiv aktiven Mutante festgestellt (Abb. 31). Der Effekt der *CDK6* S178P Mutante ist jedoch relativ gering und müsste durch andere Experimente bestätigt werden. Zudem ist die Überexpression der Mutante ein sehr artifizielles Untersuchungssystem, bei dem ein unspezifischer transaktivierender Effekt nicht ausgeschlossen werden kann. Eine geeignete Kontrolle wäre ein p65-unabhängiges Gal4-Fusionsprotein, wie Gal4-VP16 gewesen.

Bei dem Einsatz spezifischer Inhibitoren gegen TAK1 (5Z-7-Oxozeaenol), einem cytosolischen Regulator *upstream* von p65 und p38, wurde genauso wie durch Hemmung von p38 durch SB203580 keine Veränderung der globalen *CDK6*-Expression und Translokation in den Kern in synchronisierten Zellen festgestellt (Abb. 33). Die für die *CDK6*-Aktivität entscheidenden Cycline D1 und D3 werden ebenfalls nicht durch die Inhibitoren beeinflusst. Unter diesen

Bedingungen ist ein direkter Einfluss inflammatorischer Signalwege auf CDK6 als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

CDK6 enthält keine bekannt nukleäre Lokalisationssequenz (Moore et al. 1999). Eine Möglichkeit für den nukleären Transport dieser Kinase wäre ein "Huckepack"-Mechanismus, bei dem ein zweites Protein mit einem Kerntransportsignal an CDK6 bindet und somit die Translokation vermittelt.

Weiterhin wurde für CDK6 bislang keine DNA-Bindedomäne beschrieben, weshalb eine indirekte Chromatinbindung dieser Kinase wahrscheinlich ist. Diese indirekte Bindung könnte über p65 vermittelt werden, aber eine Beteiligung von weiteren noch unbekannt Kofaktoren ist sehr plausibel. Die Überexpression von CDK6 in HeLa-Zellen führte zu keiner messbaren Verstärkung der p65-Rekrutierung an den *IL8*-Promotor (Abb. 34). Wenn neben der erhöhten CDK6-Menge auch eine erhöhte Menge an einem noch unbekannt essentiellen Kofaktor für die p65-Rekrutierungsfunktion von CDK6 nötig ist, lässt sich dieser Umstand erklären.

5.6 Charakterisierung neuer Substrate und putativer Interaktionspartner von CDK6

Die Vermutung der Existenz von CDK6-Kofaktoren für die p65-Regulation wird dadurch gestützt, dass viele an Signalwegen beteiligte Proteine mehrere spezialisierte Funktionen ausüben (Huberts and van der Klei 2010) und kürzlich mittels *in silico* Analyse und *high throughput*-Kinaseassays eine große Anzahl potentieller CDK4/6-Substrate identifiziert wurde (Anders et al. 2011). Für CDK6 sind in diesem Zusammenhang bereits einige Interaktionspartner gut charakterisiert. Hierzu zählen die bekannten Substrate Rb (Meyerson and Harlow 1994), Histon H1 (Jung et al. 1994), Bcl-2 (Ojala et al. 2000) und Runx (Zhang et al. 2008). Es wäre möglich, dass das chromatingebundene CDK6 einen Einfluss auf verschiedene *Tethering*-Faktoren hat, wie es schon für andere Proteinkinasen gezeigt wurde (de Nadal and Posas 2010, Sutcliffe et al. 2011, Duch et al. 2013).

Die Verwendung des KinomeView und des Phospho-Scans in CDK6-Knockdown-Zellen bot eine sehr spezifische Möglichkeit, um neue CDK6 Substrate finden zu können, da bei allen potentiellen Substraten die CDK6-Abhängigkeit der Phosphorylierung als spezifischer Faktor mit einbezogen werden konnte (siehe 4.8.2). Mit dieser Methode wurden insgesamt 124 putative Substrate ermittelt, die Phosphorylierungsunterschiede im CDK6-Knockdown aufwiesen (Tabelle 15, Anhang). Ein besonders interessanter Kandidat war TRIP6, da es die stärkste CDK6-Abhängigkeit in G1 release Zellen zeigte (Abb. 44). Diese Abhängigkeit war dabei etwa doppelt so stark,

wie die des bekannten Substrates Rb. Eine Reihe von Befunden über den Zusammenhang des NF- κ B-Signalweges und TRIP6 unterstützen zudem die Theorie, dass dieses Protein mit CDK6 interagiert.

TRIP6 wurde im Laufe der Jahre als Adapterprotein charakterisiert, welches Bestandteil eines Multiproteinkomplexes ist und viele Signalwege in der Zelle moduliert (Willier et al. 2011). Es kann sowohl im Komplex mit dem IL-1-Rezeptor vorliegen als auch mit einer Vielzahl von Signalkomponenten, die an der NF- κ B-Aktivierung beteiligt sind (Li et al. 2005). Obwohl es aufgrund seines nukleären Exportsignals als zytoplasmatisches Protein beschrieben wurde (Wang et al. 2001), hat TRIP6 Funktionen als Transaktivator und -repressor im Nukleus. Als Transaktivator bindet und interagiert es mit Mitgliedern der c-Fos Familie und mit p65 (Kassel et al. 2004, Diefenbacher et al. 2008). Nach der Behandlung mit Glycocorticoiden unterstützt TRIP6 die Glykocoticoidrezeptor (GR)-vermittelte Repression der Aktivität von AP-1 und NF- κ B und wirkt als Transrepressor (Kassel et al. 2004).

Die vorwiegend als cytoplasmatisch beschriebene Lokalisation von TRIP6 (Wang et al. 2001, Kassel et al. 2004) konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es wurde vielmehr deutlich, dass TRIP6 zellzyklus- und IL-1-unabhängig sowohl im Cytosol als auch im Nukleus in relevanten Mengen vorhanden ist (Handschiek et al. 2014). Diese Ergebnisse stützen zusätzlich die Theorie, dass es eine Verbindung von CDK6, TRIP6 und p65 gibt. *In vitro* Kinase-Experimente mit überexprimiertem CDK6 und endogenem CDK6 zeigten keine Phosphorylierung von GST-TRIP6 (Abb. 45). Die fehlende Phosphorylierung könnte technisch begründet sein. Da für die Kinaseassays keine adequate Positivkontrolle in Form einer bekannten TRIP6-Kinase zur Verfügung stand, ist nicht auszuschließen, dass das verwendete rekombinante Protein nicht phosphoryliert werden kann. Es wäre daher wichtig phosphorylierungs-spezifische Antikörper gegen TRIP6 zu generieren. Für den Versuchsansatz war es außerdem notwendig, CDK6 aus dem Zelllysats mittels IP aufzureinigen, um die Effekte anderer Kinasen auf TRIP6 ausschließen zu können. Dies führt jedoch möglicherweise auch zur Entfernung noch unbekannter essentieller Kofaktoren. Die Bindung von TRIP6 an CDK6 konnte aber im zellfreien System mittels GST-Pulldown Assays eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 46A). Der PLA-Assay bestätigte diese Interaktion auf endogener Ebene (Abb. 46B, C). Zusätzlich war es mit dieser Methode möglich, die Interaktion von TRIP6 mit p65 nachzuweisen. Während die IL-1-abhängige kernlokalisierte Interaktion zwischen CDK6 und p65 erneut bestätigt wurde, war eine IL-1-Abhängigkeit bei der TRIP6:p65 und der TRIP6:CDK6-Interaktion nicht zu erkennen (Abb. 46B, C). Die TRIP6-Interaktionen waren

zudem sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär vorhanden und erhärten damit die Beobachtung, dass TRIP6 nicht durch IL-1 reguliert wird.

Um den Mechanismus der TRIP6-Interaktion mit CDK6 und p65 näher zu untersuchen wurden Experimente mit p65 und TRIP6 kotransfizierten Zellen durchgeführt. Diese Experimente wiesen eine erhöhte IL-1-induzierte *IL8*-Expression durch TRIP6 nach (Abb. 47A). Bei Zellen, die zusätzlich einen CDK6-Knockdown aufwiesen, war der unterstützende TRIP6-Effekt nicht zu beobachten (Abb. 47A). Die bereits beschriebene und hier bestätigte koaktivierende Funktion von TRIP6 (Kassel et al. 2004) ist deshalb sehr wahrscheinlich CDK6-abhängig. Inaktive TRIP6-Varianten, in denen die im Phospho-Scan gefundenen CDK6-spezifischen Phosphorylierungsstellen mutiert wurden, haben keinen koaktivierenden Einfluss auf die inflammatorische Genexpression (Abb. 47B). Die Funktion von TRIP6 als Koaktivator ist damit eindeutig von der Phosphorylierung durch CDK6 abhängig.

Neben TRIP6 wurden im durchgeführten Phospho-Scan viele weitere putative CDK6 Substrate identifiziert (Tabelle 15, Anhang). Einer dieser Kandidaten ist das Bromodomain-Protein ANCCA/ATAD2. Erst kürzlich wurde in der Literatur beschrieben, dass dieses Protein die TNF-vermittelte *IL8*-Expression durch Interaktion an H3K36 Methyltransferasen steigert (Yang et al. 2012).

Das als *c-myc promotor binding protein* (MBP-1) bekannte Protein DENND4A, wurde ebenfalls im Phospho-Scan identifiziert und ist ein transkriptioneller Repressor, der die Bildung des Transkriptionsinitiationskomplex verhindert (Chaudhary and Miller 1995). Die exogene DENND4A-Expression bewirkt zudem einen G0-G1 Arrest in chronischen myeloischen Leukämiezellen (Pal et al. 2011) und fungiert damit als Tumorsuppressor.

Diese und weitere Befunde aus dem Phospho-Scan und die schon untersuchten Interaktionen lassen vermuten, dass in die CDK6-vermittelte Regulation der Transkription mehrere Kofaktoren involviert sind, die ein komplexes Netzwerk an nukleären CDK6 Substraten darstellen.

Eine Suche nach Interaktionspartnern von TRIP6 könnte zum Nachweis von indirekten Interaktionspartnern führen und damit das Bild des regulatorischen Mechanismus vervollständigen.

Neben dem Phospho-Scan wurde zusätzlich auch ein Y2H-Screen für die Identifikation neuer Interaktionspartner von CDK6 eingesetzt (siehe 4.8.1). Hierbei konnte nur Cyclin I im Zusammenhang mit einer erfolgreichen Cyclin I:CDK6 Koimmunopräzipitation als möglicher Kandidat gefunden werden (Abb. 42).

Cyclin I enthält eine typische Cyclinbox nahe dem N-Terminus und zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Cyclin G, welches unabhängig vom Zellzyklus ist und in der p53-vermittelten Apoptose beteiligt ist (Gao and Zelenka 1997). Die

Cyclin I mRNA wird während des Zellzyklus konstant exprimiert (Nakamura et al. 1995). Es ist an biologischen Prozessen wie der Angiogenese und Differenzierung beteiligt, aber seine Rolle im Zellzyklus ist noch nicht hinreichend geklärt (Landberg et al. 2005). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass die Proteinmenge von Cyclin I während der S-Phase erhöht ist und ein Knockdown von Cyclin I die Zellproliferation verhindert (Nagano et al. 2013). Die Bedeutung der CDK6:Cyclin I Interaktion sollte durch weiterführende Experimente näher untersucht werden.

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum *Crosstalk* zwischen Zellzyklus und inflammatorischer Genexpression sind zusammenfassend in einem finalen Modell dargestellt (Abb. 50).

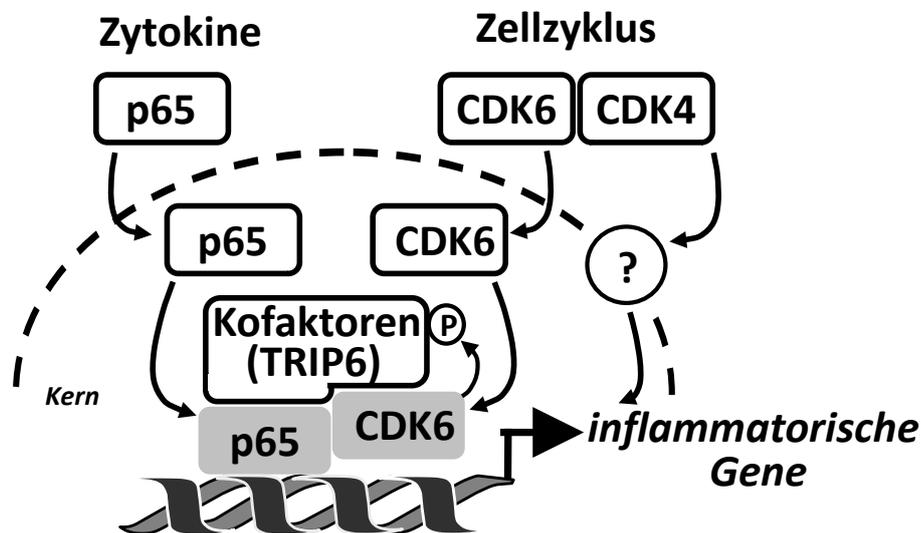


Abbildung 50: Finales Modell zum *Crosstalk* zwischen Zellzyklus und inflammatorischer Genexpression. Dargestellt sind CDK6 und CDK4 als zellzyklusrelevante Kinasen und p65 als Transkriptionsfaktor für inflammatorische Gene. CDK6 transloziert zellzyklusabhängig in den Kern und an das Chromatin. Die Kinase interagiert mit p65 und bindet zusammen mit p65 an den *IL8*-Promotor. Die homologe Kinase CDK4 hat ebenso einen Einfluss auf inflammatorische Gene, jedoch über einen noch unbekanntem Signalweg. TRIP6 konnte als neues Substrat und essentieller Kofaktor von CDK6 für die Regulation von inflammatorischen Genen identifiziert werden. Die Existenz weiterer Kofaktoren ist sehr wahrscheinlich. (Abbildung modifiziert nach Handschick et al. 2014)

5.7 Pathophysiologische Auswirkungen des CDK6-NF- κ B- *Crosstalks*

Die neue Rolle von CDK6 als nukleärer Koaktivator hat weitreichende Auswirkungen auf die Betrachtung der Zusammenhänge zwischen Zellzyklus und inflammatorischer Genregulation. Insbesondere bei der Tumorentstehung wurden beide Regulationsmechanismen bis dato als unabhängige Faktoren angesehen. Durch die hier erhobenen Befunde, kann CDK6 als ein direkter molekularer Schalter definiert werden, der zellzyklusabhängige

Genexpressionsprogramme in Gang setzen kann. Zwar wird in allen Zellzyklusphasen eine inflammatorische Genexpression induziert, diese ist allerdings durch CDK6 in sich teilenden Zellen (G1-Phase) besonders hoch (Abb. 13). Für die beobachtete große Varianz der inflammatorischen Antwort zwischen einzelnen Zellen eines entzündeten Gewebes bietet sich mit der hier beschriebenen Zellzyklusabhängigkeit eine neue Erklärungsmöglichkeit, zusätzlich zu der Theorie der zufällig verteilten Alles-oder-Nichts Antwort auf einen Zytokinstimulus (Cheong et al. 2009, Rand et al. 2012). Eine an die Proliferation gebundene spezifische inflammatorische Genexpression würde dazu führen, dass sich sowohl die angeborene Immunantwort als auch wachstumsfördernde Faktoren auf entsprechende Bereiche konzentrieren und somit den Wundheilungsprozess regulieren (Werner and Grose 2003).

Einen Hinweis für die Beteiligung von CDK6 an der Regulation entzündlicher Prozesse geben Studien, in denen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) im *CDK6*-Lokus festgestellt wurden (Raychaudhuri et al. 2008). Ausserdem konnte für CDK6 in einem *in vivo* Modell bereits eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen nachgewiesen werden. Man fand heraus, dass in CDK6-defizienten Mäusen, die eine verringerte TNF α Menge im Blut aufwiesen, die LPS-vermittelte Sterblichkeit reduziert war (Hennessy et al. 2011). Der durch LPS verursachte lethale Schock wird u.a. durch eine rasche systemische Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen hervorgerufen (Blank et al. 1997). Die schnelle transkriptionelle Induktion dieser Faktoren ist NF- κ B-abhängig.

Der postulierte Regulationsmechanismus von CDK6, TRIP6 und p65 für die inflammatorische Genexpression und damit für die Förderung der Krebsentstehung fügt sich in eine Vielzahl von weiteren Befunden verschiedener Studien ein:

Der durch den Y2H-Screen in dieser Arbeit gefundene CDK6-Interaktionspartner Cyclin I wird in Brustkrebstumoren exprimiert (Landberg et al. 2005). Eine Interaktion von Cyclin I mit CDK5 ist beschrieben, führt zur Aktivierung dieser Kinase und verhindert die Apoptose in Podocyten (Brinkkoetter et al. 2009, Taniguchi et al. 2012). CDK6 ist in malignen Lymphomen und Gliomazellen überexprimiert (Costello et al. 1997, Corcoran et al. 1999, Brito-Babapulle et al. 2002, Lujambio et al. 2007). Ein Knockdown von CDK6 in Gliomazellen führte zu einer Inhibition des Wachstums und zu erhöhter Apoptose (Li et al. 2012). Zusätzlich ist bekannt, dass das tumorinduzierende Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) über eine virale Cyclin D-Variante verfügt, die eine CAK-unabhängige Hyperaktivität von CDK6 bewirkt (Kaldis et al. 2001). Außerdem wurde bei kolorektalen Karzinomen und Glioblastomen eine

erhöhte TRIP6-Menge festgestellt, die eine verstärkte NF- κ B-Aktivität sowie eine Apoptoseresistenz zur Folge hatte (Chastre et al. 2009, Lai et al. 2010). Eine Beobachtung die durch *in vitro* Experimente dieser Arbeit gestützt wird, in denen eine Abhängigkeit der inflammatorischen Genexpression von CDK6 auch in Glioblastomazelllinien (G55 und U251) gezeigt wurde (Abb. 39).

Die reduzierte *IL8* mRNA-Expression durch einen *CDK6*-Knockdown konnte außerdem auch in KB-Zellen, sowie in nicht-transformierten Fibroblasten (MRC5) nachgewiesen werden und lässt damit vermuten, dass viele verschiedene Zelltypen den CDK6-Signalweg in Anspruch nehmen (Abb. 39). Jedoch gab es auch Zelllinien, in denen ein transienter *CDK6*-Knockdown zu keiner Veränderung der IL-1-induzierten *IL8* mRNA führte (Daten nicht gezeigt). Dies könnte zum einen durch eine stressbedingten Transfektion und damit verbundene Aktivierung des *IL8*-Gens erklärt werden, wodurch die CDK6-Effekte überlagert werden oder aber auch auf zelltypspezifische CDK6-Effekte hinweisen.

Durch die Verbindung von CDK6 und dem inflammatorischen Signalweg, wird deutlich, dass das onkogenen Potential von CDK6 noch näher untersucht werden muss. Dabei wären Experimente mit einer CDK6-S178P-Überexpression ebenso denkbar, wie der Einsatz des KSHV-Cyclins.

Die Abhängigkeit einiger Tumore von der CDK6-vermittelten inflammatorischen Genexpression bietet allerdings auch die Möglichkeit neuer therapeutischer Ansätze. Sowohl spezifische Inhibitoren von TRIP6 als auch von CDK6 wären als mögliche Therapeutika denkbar. Der in klinischen Studien verwendete CDK4/6-Inhibitor PD332991 bietet ein gutes Beispiel für die Effizienz solcher Wirkstoffe. Der in dieser Arbeit dargelegte Regulationsmechanismus weist allerdings auch auf bisher unbeachtete mögliche Nebenwirkungen hin, die für die Entwicklung neuer Medikamente in Betracht gezogen werden müssen. Eine Inhibition der angeborenen Immunantwort durch den Inhibitor PD332991 ist auf der Basis der in dieser Arbeit erhobenen Befunde nicht auszuschließen (Lapenna and Giordano 2009, Flaherty et al. 2012, Leonard et al. 2012).

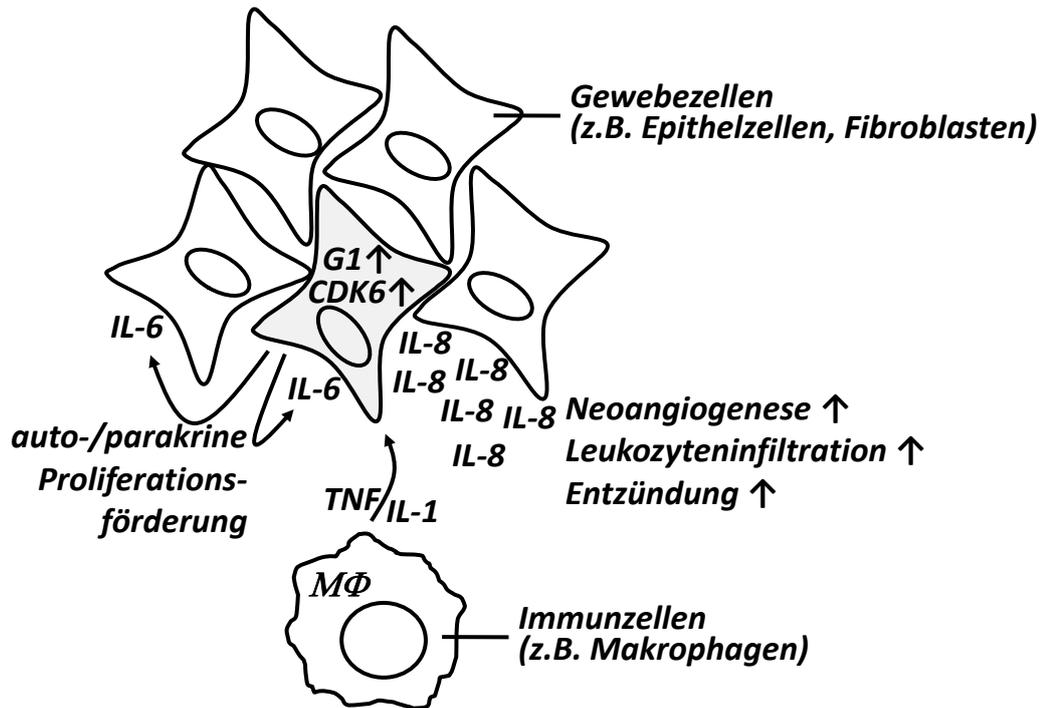


Abbildung 51: (Patho)physiologische Relevanz der Befunde dieser Arbeit. Tumorzellen mit einem aktivierten CDK6-Signalweg (durch CDK6-Genamplifikation, CDK6-Überexpression, Cyclin D-Überexpression oder Verminderung von INK-Proteinen) oder normal proliferierende Zellen in G1 zeigen eine erhöhte Expression proinflammatorischer Faktoren. Deren Sekretion wird durch IL-1 oder TNF, welche durch ortsständige oder einwandernde Makrophagen ($M\Phi$) freigesetzt werden, induziert. Faktoren wie IL-6 und IL-8 amplifizieren das lokale Zellwachstum, die Neoangiogenese und weitere Infiltration von Immunzellen und fördern so die Tumorprogression oder Entzündung.

6. Zusammenfassung

Der Eintritt einer Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus wird durch die Synthese von D-Cyclinen initiiert, die an die cyclinabhängigen Proteinkinasen CDK4 und CDK6 binden und diese aktivieren. CDK4 und CDK6 phosphorylieren in der Folge das Retinoblastom Protein Rb und aktivieren damit indirekt den Transkriptionsfaktor E2F. Dieser Arbeit vorausgehende Befunde identifizierten CDK6 darüber hinaus als eine Kinase, die *in vitro* die p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B phosphoryliert. P65 NF- κ B fungiert neben vielen anderen Funktionen als ein essentieller Regulator der zytokin-vermittelten inflammatorischen Genexpression. Durch kontrollierbare Überexpression einer katalytisch aktiven CDK6-Variante konnte in Zellkulturen und auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass CDK6 die Interleukin(IL)-1-abhängige Expression des Chemokins IL-8 verstärkt. Genomweite Untersuchungen ergaben, dass der synchronisierte Eintritt von humanen epithelialen Tumorzelllinien in die G1-Phase neben *IL8* noch eine Reihe von weiteren proinflammatorischen Genen induzieren kann. Dieser Effekt war in Zelllinien, die eine shRNA-vermittelte Suppression von CDK6 oder CDK4 aufwiesen, stark vermindert und konnte insbesondere für CDK6 auch in nicht-synchronisierten Zellen beobachtet werden. Verschiedene Interaktionsassays, wie Kolokalisationsstudien, Koimmunopräzipitationen und *proximity ligation assays* (PLA) wiesen eine IL-1-regulierbare Interaktion von CDK6 mit p65 im Zellkern und in der Chromatinfraction nach. Die Suppression von CDK6 führte zu einer Abnahme des chromatin-assoziierten p65 und einer Reduktion der Phosphorylierung an Ser536, einer Modifikation, die für den Kernimport von p65 eine Rolle spielen könnte. Darüber hinaus konnte mittels Chromatinimmunpräzipitations-Experimenten eine Korekrutierung von CDK6 und p65 an den *IL8*-Locus gezeigt werden. Offenbar reguliert CDK6 die Bindung von p65 an den *IL8*-Promotor und in der Folge die Beladung des *IL8*-Locus mit RNA Polymerase II. Proteomweite Untersuchungen mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen putative CDK6-Substrate führten zur Identifikation des Koaktivators TRIP6, dessen Interaktion mit p65 und CDK6 im Zytosol und Zellkern mittels PLA nachgewiesen wurde. Mutationen der CDK6-Phosphorylierungsstellen in TRIP6 führten zur Aufhebung der Koaktivator-Funktion von TRIP6 bei der p65-vermittelten *IL8*-Expression.

Neben den neuen Erkenntnissen zu CDK6-Zielgenen und zur CDK6-Chromatinassoziation beschreiben diese Ergebnisse eine bisher nicht bekannte molekulare Verbindung, über die der Zellzyklus an inflammatorische Genexpressionsprogramme gekoppelt werden kann. Die biologische Bedeutung

dieser Beobachtung ergibt sich daraus, dass in vielen Tumoren der G1-CDK6-Signalweg durch Überexpression der Kinase, von D-Cyclinen oder durch verminderte Expression von Zellzyklusinhibitor-Proteinen hyperaktiviert ist. Dieses führt nicht nur zu einer unphysiologisch hohen Zellteilung des Tumors, sondern trägt entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit auch zu einer gesteigerten Synthese von proinflammatorischen Faktoren wie *IL8* und *IL6* bei. Diese können in Folge das Tumormikromilieu modulieren und so das Tumorwachstum fördern. In analoger Art und Weise könnte CDK6 durch die Amplifikation der Synthese von Entzündungsmediatoren in proliferierenden Zellen im Rahmen der Wundheilung auch in gesunden Geweben eine zusätzliche Bedeutung haben.

Schlagwörter: Zellzyklus, CDK6, IL-1, *IL8*, Chromatin

7. Summary

The entry of cells into the G1 phase of the cell cycle is initiated by D-cyclins which bind to and thereby activate the cyclin-dependent protein kinases CDK4 and CDK6. Subsequently, CDK4 and CDK6 phosphorylate the retinoblastoma protein Rb which indirectly leads to activation of the transcription factor E2F. Results preceding this thesis identified CDK6 additionally as a kinase which *in vitro* phosphorylates the p65 subunit of the transcription factor NF- κ B. Besides multiple other functions p65 serves as an essential regulator of cytokine-mediated inflammatory gene expression. By conditional overexpression of a catalytically active variant of CDK6 we found in cell cultures as well as in single cells that CDK6 augments interleukin(IL)-1-induced expression of the chemokine IL-8. Genome-wide experiments revealed that synchronized entry of human epithelial cells into the G1 phase upregulates a variety of inflammatory genes in addition to *IL8*. This effect was strongly reduced in cells with shRNA-mediated suppression of CDK6 or CDK4. Particularly for CDK6 this phenomenon was also observed in unsynchronized cells. By a variety of interaction assays, such as colocalization studies, coimmunoprecipitations and proximity ligation assays (PLA) we validated an IL-1-inducible interaction of CDK6 with p65 in the nucleus and in the chromatin fraction. The suppression of CDK6 caused a reduction of association of p65 with the chromatin fraction and lowered phosphorylation at serine 536, a modification of p65 which could play a role for the nuclear import of this factor. In addition, a corecruitment of CDK6 and p65 at the *IL8* locus was found by chromatin immunoprecipitation. Apparently, CDK6 regulates recruitment of p65 to the *IL8* promoter and subsequently the loading of the *IL8* locus with RNA polymerase II. Proteome-wide experiments using phosphorylation site specific antibodies directed against putative CDK6 substrates resulted in identification of the coactivator TRIP6 whose interaction with p65 and CDK6 in the cytoplasm and the nucleus was validated by PLA. Mutations of the CDK6 phosphorylation sites in TRIP6 abolished the coactivating function of TRIP6 in p65-mediated *IL8* expression. In addition to the new findings concerning CDK6 target genes and the association of CDK6 with chromatin these results describe an up to now unknown molecular connection by which the cell cycle can be linked to inflammatory gene expression programs. The biological significance of this observation is based on the fact that in many tumors the G1-CDK6 is hyperactivated due to overexpression of the kinase, of D-cyclins or diminished expression of cell cycle inhibitor proteins. According to the results of this thesis, this not only leads to a non-physiologically high rate of cell proliferation but also contributes to the

enhanced synthesis of proinflammatory factors such as IL8 or IL6. These cytokines in turn can modulate the tumor microenvironment and thereby promote tumor growth. In an analogous fashion CDK6 might amplify the synthesis of inflammatory mediators in proliferating cells upon wound healing reactions indicating an additional role of this kinase in healthy tissues.

keywords: cell cycle, CDK6, IL-1, *IL8*, chromatin

8. Literaturverzeichnis

Aggarwal, B. B. and K. Natarajan (1996). "Tumor necrosis factors: developments during the last decade." *Eur Cytokine Netw* **7**(2): 93-124.

Anders, L., N. Ke, P. Hydring, Y. J. Choi, H. R. Widlund, J. M. Chick, H. Zhai, M. Vidal, S. P. Gygi, P. Braun and P. Sicinski (2011). "A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells." *Cancer Cell* **20**(5): 620-634.

Assoian, R. K. and X. Zhu (1997). "Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression." *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 93-98.

Baggiolini, M. (2001). "Chemokines in pathology and medicine." *J Intern Med* **250**(2): 91-104.

Bates, S., L. Bonetta, D. MacAllan, D. Parry, A. Holder, C. Dickson and G. Peters (1994). "CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1." *Oncogene* **9**(1): 71-79.

Baud, V. and M. Karin (2009). "Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls." *Nat Rev Drug Discov* **8**(1): 33-40.

Baughn, L. B., M. Di Liberto, K. Wu, P. L. Toogood, T. Louie, R. Gottschalk, R. Niesvizky, H. Cho, S. Ely, M. A. Moore and S. Chen-Kiang (2006). "A novel orally active small molecule potently induces G1 arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6." *Cancer Res* **66**(15): 7661-7667.

Bignell, G. R., C. D. Greenman, H. Davies, A. P. Butler, S. Edkins, J. M. Andrews, G. Buck, L. Chen, D. Beare, C. Latimer, S. Widaa, J. Hinton, C. Fahey, B. Fu, S. Swamy, G. L. Dalglish, B. T. Teh, P. Deloukas, F. Yang, P. J. Campbell, P. A. Futreal and M. R. Stratton (2010). "Signatures of mutation and selection in the cancer genome." *Nature* **463**(7283): 893-898.

Blain, S. W., E. Montalvo and J. Massague (1997). "Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4." *J Biol Chem* **272**(41): 25863-25872.

Blank, C., A. Luz, S. Bendigs, A. Erdmann, H. Wagner and K. Heeg (1997). "Superantigen and endotoxin synergize in the induction of lethal shock." *Eur J Immunol* **27**(4): 825-833.

Bockstaele, L., X. Bisteau, S. Paternot and P. P. Roger (2009). "Differential regulation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK6, evidence that CDK4 might not be activated by CDK7, and design of a CDK6 activating mutation." *Mol Cell Biol* **29**(15): 4188-4200.

Bockstaele, L., K. Coulonval, H. Kooken, S. Paternot and P. P. Roger (2006). "Regulation of CDK4." *Cell Div* **1**: 25.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brinkkoetter, P. T., P. Olivier, J. S. Wu, S. Henderson, R. D. Krofft, J. W. Pippin, D. Hockenbery, J. M. Roberts and S. J. Shankland (2009). "Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells." *J Clin Invest* **119**(10): 3089-3101.

Brito-Babapulle, V., A. M. Gruszka-Westwood, G. Platt, C. L. Andersen, M. O. Elnenaei, E. Matutes, A. C. Wotherspoon, S. G. Weston-Smith and D. Catovsky (2002). "Translocation t(2;7)(p12;q21-22) with dysregulation of the CDK6 gene mapping to 7q21-22 in a non-Hodgkin's lymphoma with leukemia." *Haematologica* **87**(4): 357-362.

Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso and U. Siebenlist (1995). "Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation." *Science* **267**(5203): 1485-1488.

Burke, J. R., A. J. Deshong, J. G. Pelton and S. M. Rubin (2010). "Phosphorylation-induced conformational changes in the retinoblastoma protein inhibit E2F transactivation domain binding." *J Biol Chem* **285**(21): 16286-16293.

Burke, J. R., G. L. Hura and S. M. Rubin (2012). "Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control." *Genes Dev* **26**(11): 1156-1166.

Burns, F. J. and I. F. Tannock (1970). "On the existence of a G₀-phase in the cell cycle." *Cell Tissue Kinet* **3**(4): 321-334.

Buss, H., A. Dorrie, M. L. Schmitz, R. Frank, M. Livingstone, K. Resch and M. Kracht (2004). "Phosphorylation of serine 468 by GSK-3 β negatively regulates basal p65 NF- κ B activity." *J Biol Chem* **279**(48): 49571-49574.

Buss, H., A. Dorrie, M. L. Schmitz, E. Hoffmann, K. Resch and M. Kracht (2004). "Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription." *J Biol Chem* **279**(53): 55633-55643.

Buss, H., K. Handschick, N. Jurrmann, P. Pekkonen, K. Beuerlein, H. Muller, R. Wait, J. Saklatvala, P. M. Ojala, M. L. Schmitz, M. Naumann and M. Kracht (2012). "Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- κ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression." *PLoS One* **7**(12): e51847.

Cannell, E. and S. Mittnacht (1999). "Viral encoded cyclins." *Semin Cancer Biol* **9**(3): 221-229.

Chan, F. K., J. Zhang, L. Cheng, D. N. Shapiro and A. Winoto (1995). "Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{ink4}." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2682-2688.

Chang, Y., P. S. Moore, S. J. Talbot, C. H. Boshoff, T. Zarkowska, K. Godden, H. Paterson, R. A. Weiss and S. Mittnacht (1996). "Cyclin encoded by KS herpesvirus." *Nature* **382**(6590): 410.

Chastre, E., M. Abdessamad, A. Kruglov, E. Bruyneel, M. Bracke, Y. Di Gioia, M. C. Beckerle, F. van Roy and L. Kotelevets (2009). "TRIP6, a novel molecular partner of the MAGI-1 scaffolding molecule, promotes invasiveness." *FASEB J* **23**(3): 916-928.

Chaudhary, D. and D. M. Miller (1995). "The c-myc promoter binding protein (MBP-1) and TBP bind simultaneously in the minor groove of the c-myc P2 promoter." *Biochemistry* **34**(10): 3438-3445.

Chen, L. F. and W. C. Greene (2004). "Shaping the nuclear action of NF- κ B." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 392-401.

Chen, L. F., S. A. Williams, Y. Mu, H. Nakano, J. M. Duerr, L. Buckbinder and W. C. Greene (2005). "NF- κ B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation." *Mol Cell Biol* **25**(18): 7966-7975.

Chen, Z. J. (2012). "Ubiquitination in signaling to and activation of IKK." *Immunol Rev* **246**(1): 95-106.

Cheng, M., P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts and C. J. Sherr (1999). "The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts." *EMBO J* **18**(6): 1571-1583.

Cheong, R., C. J. Wang and A. Levchenko (2009). "High content cell screening in a microfluidic device." *Mol Cell Proteomics* **8**(3): 433-442.

Cheung, P. C., A. R. Nebreda and P. Cohen (2004). "TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1." *Biochem J* **378**(Pt 1): 27-34.

Ciemerych, M. A. and P. Sicinski (2005). "Cell cycle in mouse development." *Oncogene* **24**(17): 2877-2898.

Cooper GM. "The Eukaryotic Cell Cycle" in *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

Corcoran, M. M., S. J. Mould, J. A. Orchard, R. E. Ibbotson, R. M. Chapman, A. P. Boright, C. Platt, L. C. Tsui, S. W. Scherer and D. G. Oscier (1999). "Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations." *Oncogene* **18**(46): 6271-6277.

Costello, J. F., C. Plass, W. Arap, V. M. Chapman, W. A. Held, M. S. Berger, H. J. Su Huang and W. K. Cavenee (1997). "Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA." *Cancer Res* **57**(7): 1250-1254.

- Covert, M. W., T. H. Leung, J. E. Gaston and D. Baltimore (2005).** "Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation." *Science* **309**(5742): 1854-1857.
- de Nadal, E. and F. Posas (2010).** "Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases." *EMBO J* **29**(1): 4-13.
- Desai, S. R., P. P. Pillai, R. S. Patel, A. N. McCray, H. Y. Win-Piazza and M. E. Acevedo-Duncan (2012).** "Regulation of Cdk7 activity through a phosphatidylinositol (3)-kinase/PKC- ι -mediated signaling cascade in glioblastoma." *Carcinogenesis* **33**(1): 10-19.
- DiDonato, J. A., F. Mercurio and M. Karin (2012).** "NF-kappaB and the link between inflammation and cancer." *Immunol Rev* **246**(1): 379-400.
- Diefenbacher, M., S. Sekula, C. Heilbock, J. V. Maier, M. Litfin, H. van Dam, M. Castellazzi, P. Herrlich and O. Kassel (2008).** "Restriction to Fos family members of Trip6-dependent coactivation and glucocorticoid receptor-dependent trans-repression of activator protein-1." *Mol Endocrinol* **22**(8): 1767-1780.
- Dinarello, C. A. (1996).** "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* **87**(6): 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (2009).** "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annu Rev Immunol* **27**: 519-550.
- Duch, A., E. de Nadal and F. Posas (2013).** "Dealing with Transcriptional Outbursts during S Phase to Protect Genomic Integrity." *J Mol Biol* **425**(23): 4745-4755.
- Easton, J., T. Wei, J. M. Lahti and V. J. Kidd (1998).** "Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma." *Cancer Res* **58**(12): 2624-2632.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993).** "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-825.
- Ericson, K. K., D. Krull, P. Slomiany and M. J. Grossel (2003).** "Expression of cyclin-dependent kinase 6, but not cyclin-dependent kinase 4, alters morphology of cultured mouse astrocytes." *Mol Cancer Res* **1**(9): 654-664.
- Errico, A., K. Deshmukh, Y. Tanaka, A. Pozniakovsky and T. Hunt (2010).** "Identification of substrates for cyclin dependent kinases." *Adv Enzyme Regul* **50**(1): 375-399.
- Fesquet, D., J. C. Labbe, J. Derancourt, J. P. Capony, S. Galas, F. Girard, T. Lorca, J. Shuttleworth, M. Doree and J. C. Cavadore (1993).** "The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues." *EMBO J* **12**(8): 3111-3121.
- Fields, S. and O. Song (1989).** "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* **340**(6230): 245-246.
- Finn, R. S., J. Dering, D. Conklin, O. Kalous, D. J. Cohen, A. J. Desai, C. Ginther, M. Atefi, I. Chen, C. Fowst, G. Los and D. J. Slamon (2009).** "PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro." *Breast Cancer Res* **11**(5): R77.
- Fisher, R. P. (2005).** "Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription." *J Cell Sci* **118**(Pt 22): 5171-5180.
- Fisher, R. P. (2012).** "The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression." *Genes Cancer* **3**(11-12): 731-738.
- Fisher, R. P., P. Jin, H. M. Chamberlin and D. O. Morgan (1995).** "Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase." *Cell* **83**(1): 47-57.
- Flaherty, K. T., P. M. Lorusso, A. Demichele, V. G. Abramson, R. Courtney, S. S. Randolph, M. N. Shaik, K. D. Wilner, P. J. O'Dwyer and G. K. Schwartz (2012).** "Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer." *Clin Cancer Res* **18**(2): 568-576.
- Fry, D. W., P. J. Harvey, P. R. Keller, W. L. Elliott, M. Meade, E. Trachet, M. Albassam, X. Zheng, W. R. Leopold, N. K. Pryer and P. L. Toogood (2004).** "Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts." *Mol Cancer Ther* **3**(11): 1427-1438.

- Gaestel, M., A. Kotlyarov and M. Kracht (2009).** "Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation." Nat Rev Drug Discov **8**(6): 480-499.
- Galderisi, U., F. P. Jori and A. Giordano (2003).** "Cell cycle regulation and neural differentiation." Oncogene **22**(33): 5208-5219.
- Gao, C. Y. and P. S. Zelenka (1997).** "Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation." Bioessays **19**(4): 307-315.
- Ghosh, S. and M. S. Hayden (2008).** "New regulators of NF-kappaB in inflammation." Nat Rev Immunol **8**(11): 837-848.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998).** "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-260.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen and H. Bujard (1995).** "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-1769.
- Grossel, M. J. and P. W. Hinds (2006).** "Beyond the cell cycle: a new role for Cdk6 in differentiation." J Cell Biochem **97**(3): 485-493.
- Guan, K. L., C. W. Jenkins, Y. Li, M. A. Nichols, X. Wu, C. L. O'Keefe, A. G. Matera and Y. Xiong (1994).** "Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function." Genes Dev **8**(24): 2939-2952.
- Guan, K. L., C. W. Jenkins, Y. Li, C. L. O'Keefe, S. Noh, X. Wu, M. Zariwala, A. G. Matera and Y. Xiong (1996).** "Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4." Mol Biol Cell **7**(1): 57-70.
- Guttridge, D. C., C. Albanese, J. Y. Reuther, R. G. Pestell and A. S. Baldwin, Jr. (1999).** "NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1." Mol Cell Biol **19**(8): 5785-5799.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011).** "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Handschick, K., K. Beuerlein, L. Jurida, M. Bartkuhn, H. Muller, J. Soelch, A. Weber, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, M. Scharfe, M. Jarek, J. Stellzig, M. L. Schmitz and M. Kracht (2014).** "Cyclin-Dependent Kinase 6 Is a Chromatin-Bound Cofactor for NF-kappaB-Dependent Gene Expression." Mol Cell **53**(2): 193-208.
- Hanks, S. K. (1987).** "Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(2): 388-392.
- Hannink, M. and H. M. Temin (1989).** "Transactivation of gene expression by nuclear and cytoplasmic rel proteins." Mol Cell Biol **9**(10): 4323-4336.
- Hannon, G. J. and D. Beach (1994).** "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest." Nature **371**(6494): 257-261.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989).** "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science **246**(4930): 629-634.
- Hatada, E. N., M. Naumann and C. Scheidereit (1993).** "Common structural constituents confer I kappa B activity to NF-kappa B p105 and I kappa B/MAD-3." EMBO J **12**(7): 2781-2788.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008).** "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Heissmeyer, V., D. Krappmann, E. N. Hatada and C. Scheidereit (2001).** "Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha." Mol Cell Biol **21**(4): 1024-1035.
- Hennessy, E. J., F. J. Sheedy, D. Santamaria, M. Barbacid and L. A. O'Neill (2011).** "Toll-like receptor-4 (TLR4) down-regulates microRNA-107, increasing macrophage adhesion via cyclin-dependent kinase 6." J Biol Chem **286**(29): 25531-25539.
- Hinz, M., D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit and M. Strauss (1999).** "NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition." Mol Cell Biol **19**(4): 2690-2698.

- Hoesel, B. and J. A. Schmid (2013).** "The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer." Mol Cancer **12**: 86.
- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann and M. Kracht (2002).** "Multiple control of interleukin-8 gene expression." J Leukoc Biol **72**(5): 847-855.
- Hu, J., M. Haseebuddin, M. Young and N. H. Colburn (2005).** "Suppression of p65 phosphorylation coincides with inhibition of IkappaBalpha polyubiquitination and degradation." Mol Carcinog **44**(4): 274-284.
- Hu, M. G., A. Deshpande, M. Enos, D. Mao, E. A. Hinds, G. F. Hu, R. Chang, Z. Guo, M. Dose, C. Mao, P. N. Tschlis, F. Gounari and P. W. Hinds (2009).** "A requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis." Cancer Res **69**(3): 810-818.
- Huang, B., X. D. Yang, A. Lamb and L. F. Chen (2010).** "Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway." Cell Signal **22**(9): 1282-1290.
- Huberts, D. H. and I. J. van der Klei (2010).** "Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking." Biochim Biophys Acta **1803**(4): 520-525.
- Hwang, H. C. and B. E. Clurman (2005).** "Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles." Oncogene **24**(17): 2776-2786.
- Joyce, D., C. Albanese, J. Steer, M. Fu, B. Bouzahzah and R. G. Pestell (2001).** "NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 73-90.
- Jung, J. U., M. Stager and R. C. Desrosiers (1994).** "Virus-encoded cyclin." Mol Cell Biol **14**(11): 7235-7244.
- Kaldis, P., P. M. Ojala, L. Tong, T. P. Makela and M. J. Solomon (2001).** "CAK-independent activation of CDK6 by a viral cyclin." Mol Biol Cell **12**(12): 3987-3999.
- Kaldis, P., A. A. Russo, H. S. Chou, N. P. Pavletich and M. J. Solomon (1998).** "Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities." Mol Biol Cell **9**(9): 2545-2560.
- Kassel, O., S. Schneider, C. Heilbock, M. Litfin, M. Gottlicher and P. Herrlich (2004).** "A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-kappaB-regulated promoters." Genes Dev **18**(20): 2518-2528.
- Kato, J. Y., M. Matsuoka, D. K. Strom and C. J. Sherr (1994).** "Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase." Mol Cell Biol **14**(4): 2713-2721.
- Kawakami, K., C. Scheidereit and R. G. Roeder (1988).** "Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4700-4704.
- Kim, H. J., N. Hawke and A. S. Baldwin (2006).** "NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer." Cell Death Differ **13**(5): 738-747.
- Kollmann, K., G. Heller, C. Schneckenleithner, W. Warsch, R. Scheicher, R. G. Ott, M. Schafer, S. Fajmann, M. Schleder, A. I. Schiefer, U. Reichart, M. Mayerhofer, C. Hoeller, S. Zochbauer-Muller, D. Kerjaschki, C. Bock, L. Kenner, G. Hoefler, M. Freissmuth, A. R. Green, R. Moriggl, M. Busslinger, M. Malumbres and V. Sexl (2013).** "A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis." Cancer Cell **24**(2): 167-181.
- Konecny, G. E., B. Winterhoff, T. Kolarova, J. Qi, K. Manivong, J. Dering, G. Yang, M. Chalukya, H. J. Wang, L. Anderson, K. R. Kalli, R. S. Finn, C. Ginther, S. Jones, V. E. Velculescu, D. Riehle, W. A. Cliby, S. Randolph, M. Koehler, L. C. Hartmann and D. J. Slamon (2011).** "Expression of p16 and retinoblastoma determines response to CDK4/6 inhibition in ovarian cancer." Clin Cancer Res **17**(6): 1591-1602.
- Kozar, K. and P. Sicinski (2005).** "Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes." Cell Cycle **4**(3): 388-391.
- Kracht, M. and J. Saklatvala (2002).** "Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation." Cytokine **20**(3): 91-106.
- Krause, A., H. Holtmann, S. Eickemeier, R. Winzen, M. Szamel, K. Resch, J. Saklatvala and M. Kracht (1998).** "Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for

interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB." *J Biol Chem* **273**(37): 23681-23689.

Kucharczak, J., M. J. Simmons, Y. Fan and C. Gelinas (2003). "To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis." *Oncogene* **22**(56): 8961-8982.

Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* **81**(2): 807-869.

LaBaer, J., M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sandhu, H. S. Chou, A. Fattaey and E. Harlow (1997). "New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors." *Genes Dev* **11**(7): 847-862.

Lai, Y. J., V. T. Lin, Y. Zheng, E. N. Benveniste and F. T. Lin (2010). "The adaptor protein TRIP6 antagonizes Fas-induced apoptosis but promotes its effect on cell migration." *Mol Cell Biol* **30**(23): 5582-5596.

Laman, H. and C. Boshoff (2001). "Is KSHV lytic growth induced by a methylation-sensitive switch?" *Trends Microbiol* **9**(10): 464-466.

Laman, H., D. J. Mann and N. C. Jones (2000). "Viral-encoded cyclins." *Curr Opin Genet Dev* **10**(1): 70-74.

Landberg, G., K. Nilsson, K. Jirstrom, L. Ryden, R. Kitching, A. M. Burger and A. Seth (2005). "Cyclin I is expressed in human breast cancer and closely associated with VEGF and KDR expression." *Breast Cancer Res Treat* **89**(3): 313-316.

Lapenna, S. and A. Giordano (2009). "Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer." *Nat Rev Drug Discov* **8**(7): 547-566.

Latres, E., M. Malumbres, R. Sotillo, J. Martin, S. Ortega, J. Martin-Caballero, J. M. Flores, C. Cordon-Cardo and M. Barbacid (2000). "Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis." *EMBO J* **19**(13): 3496-3506.

Lees, E. M. and E. Harlow (1993). "Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase." *Mol Cell Biol* **13**(2): 1194-1201.

Leonard, J. P., A. S. LaCasce, M. R. Smith, A. Noy, L. R. Chirieac, S. J. Rodig, J. Q. Yu, S. Vallabhajosula, H. Schoder, P. English, D. S. Neuberg, P. Martin, M. M. Millenson, S. A. Ely, R. Courtney, N. Shaik, K. D. Wilner, S. Randolph, A. D. Van den Abbeele, S. Y. Chen-Kiang, J. T. Yap and G. I. Shapiro (2012). "Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma." *Blood* **119**(20): 4597-4607.

Li, B., H. He, B. B. Tao, Z. Y. Zhao, G. H. Hu, C. Luo, J. X. Chen, X. H. Ding, P. Sheng, Y. Dong, L. Zhang and Y. C. Lu (2012). "Knockdown of CDK6 enhances glioma sensitivity to chemotherapy." *Oncol Rep* **28**(3): 909-914.

Li, L., L. H. Bin, F. Li, Y. Liu, D. Chen, Z. Zhai and H. B. Shu (2005). "TRIP6 is a RIP2-associated common signaling component of multiple NF-kappaB activation pathways." *J Cell Sci* **118**(Pt 3): 555-563.

Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." *Nat Rev Immunol* **2**(10): 725-734.

Lim, C. A., F. Yao, J. J. Wong, J. George, H. Xu, K. P. Chiu, W. K. Sung, L. Lipovich, V. B. Vega, J. Chen, A. Shahab, X. D. Zhao, M. Hibberd, C. L. Wei, B. Lim, H. H. Ng, Y. Ruan and K. C. Chin (2007). "Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation." *Mol Cell* **27**(4): 622-635.

Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.

Lolli, G. and L. N. Johnson (2005). "CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs?" *Cell Cycle* **4**(4): 572-577.

Lujambio, A., S. Ropero, E. Ballestar, M. F. Fraga, C. Cerrato, F. Setien, S. Casado, A. Suarez-Gauthier, M. Sanchez-Cespedes, A. Git, I. Spiteri, P. P. Das, C. Caldas, E. Miska and M. Esteller (2007). "Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells." *Cancer Res* **67**(4): 1424-1429.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(3): 222-231.

- Malumbres, M. and M. Barbacid (2005).** "Mammalian cyclin-dependent kinases." Trends Biochem Sci **30**(11): 630-641.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009a).** "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.
- Malumbres, M., E. Harlow, T. Hunt, T. Hunter, J. M. Lahti, G. Manning, D. O. Morgan, L. H. Tsai and D. J. Wolgemuth (2009b).** "Cyclin-dependent kinases: a family portrait." Nat Cell Biol **11**(11): 1275-1276.
- Malumbres, M., R. Sotillo, D. Santamaria, J. Galan, A. Cerezo, S. Ortega, P. Dubus and M. Barbacid (2004).** "Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6." Cell **118**(4): 493-504.
- Manna, S. K. and G. T. Ramesh (2005).** "Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway." J Biol Chem **280**(8): 7010-7021.
- Martone, R., G. Euskirchen, P. Bertone, S. Hartman, T. E. Royce, N. M. Luscombe, J. L. Rinn, F. K. Nelson, P. Miller, M. Gerstein, S. Weissman and M. Snyder (2003).** "Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12247-12252.
- Matsuki, Y., T. Yamamoto and K. Hara (1991).** "Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues." Am J Pathol **138**(6): 1299-1305.
- Matsuoka, M., J. Y. Kato, R. P. Fisher, D. O. Morgan and C. J. Sherr (1994).** "Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase." Mol Cell Biol **14**(11): 7265-7275.
- Matsushime, H., D. E. Quelle, S. A. Shurtleff, M. Shibuya, C. J. Sherr and J. Y. Kato (1994).** "D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells." Mol Cell Biol **14**(3): 2066-2076.
- Mattioli, I., H. Geng, A. Sebald, M. Hodel, C. Bucher, M. Kracht and M. L. Schmitz (2006).** "Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon." J Biol Chem **281**(10): 6175-6183.
- Mattioli, I., A. Sebald, C. Bucher, R. P. Charles, H. Nakano, T. Doi, M. Kracht and M. L. Schmitz (2004).** "Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import." J Immunol **172**(10): 6336-6344.
- Meyerson, M., G. H. Enders, C. L. Wu, L. K. Su, C. Gorka, C. Nelson, E. Harlow and L. H. Tsai (1992).** "A family of human cdc2-related protein kinases." EMBO J **11**(8): 2909-2917.
- Meyerson, M. and E. Harlow (1994).** "Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner." Mol Cell Biol **14**(3): 2077-2086.
- Michaud, K., D. A. Solomon, E. Oermann, J. S. Kim, W. Z. Zhong, M. D. Prados, T. Ozawa, C. D. James and T. Waldman (2010).** "Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts." Cancer Res **70**(8): 3228-3238.
- Moore, J. D., J. Yang, R. Truant and S. Kornbluth (1999).** "Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1." J Cell Biol **144**(2): 213-224.
- Morgan, D. O. (1995).** "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-134.
- Morgan, D. O. (1997).** "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.
- Moriguchi, T., N. Kuroyanagi, K. Yamaguchi, Y. Gotoh, K. Irie, T. Kano, K. Shirakabe, Y. Muro, H. Shibuya, K. Matsumoto, E. Nishida and M. Hagiwara (1996).** "A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3." J Biol Chem **271**(23): 13675-13679.
- Muller, H., A. P. Bracken, R. Vernell, M. C. Moroni, F. Christians, E. Grassilli, E. Prosperini, E. Vigo, J. D. Oliner and K. Helin (2001).** "E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis." Genes Dev **15**(3): 267-285.
- Nagano, T., T. Hashimoto, A. Nakashima, S. Hisanaga, U. Kikkawa and S. Kamada (2013).** "Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression." Cell Cycle **12**(16): 2617-2624.

- Nakamura, T., R. Sanokawa, Y. F. Sasaki, D. Ayusawa, M. Oishi and N. Mori (1995).** "Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain." *Exp Cell Res* **221**(2): 534-542.
- Natoli, G., S. Sacconi, D. Bosisio and I. Marazzi (2005).** "Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time." *Nat Immunol* **6**(5): 439-445.
- Nevins, J. R. (2001).** "The Rb/E2F pathway and cancer." *Hum Mol Genet* **10**(7): 699-703.
- Noh, S. J., Y. Li, Y. Xiong and K. L. Guan (1999).** "Identification of functional elements of p18INK4C essential for binding and inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 4 and CDK6." *Cancer Res* **59**(3): 558-564.
- Nugent, J. H., C. E. Alfa, T. Young and J. S. Hyams (1991).** "Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis." *J Cell Sci* **99** (Pt 3): 669-674.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts and M. Pagano (1995).** "Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2612-2624.
- Ojala, P. M., K. Yamamoto, E. Castanos-Velez, P. Biberfeld, S. J. Korsmeyer and T. P. Makela (2000).** "The apoptotic v-cyclin-CDK6 complex phosphorylates and inactivates Bcl-2." *Nat Cell Biol* **2**(11): 819-825.
- Ortega, S., M. Malumbres and M. Barbacid (2002).** "Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1602**(1): 73-87.
- Pahl, H. L. (1999).** "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6853-6866.
- Pal, P., J. K. Kanaujiya, S. Lochab, S. B. Tripathi, M. L. Bhatt, P. K. Singh, S. Sanyal and A. K. Trivedi (2011).** "2-D gel electrophoresis-based proteomic analysis reveals that ormeloxifen induces G0-G1 growth arrest and ERK-mediated apoptosis in chronic myeloid leukemia cells K562." *Proteomics* **11**(8): 1517-1529.
- Paternot, S. and P. P. Roger (2009).** "Combined inhibition of MEK and mammalian target of rapamycin abolishes phosphorylation of cyclin-dependent kinase 4 in glioblastoma cell lines and prevents their proliferation." *Cancer Res* **69**(11): 4577-4581.
- Pavletich, N. P. (1999).** "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk's, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors." *J Mol Biol* **287**(5): 821-828.
- Payne, D. M., A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. J. Weber and T. W. Sturgill (1991).** "Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)." *EMBO J* **10**(4): 885-892.
- Perkins, N. D. (2012).** "The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer." *Nat Rev Cancer* **12**(2): 121-132.
- Pines, J. and T. Hunter (1989).** "Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2." *Cell* **58**(5): 833-846.
- Poon, R. Y., K. Yamashita, M. Howell, M. A. Ershler, A. Belyavsky and T. Hunt (1994).** "Cell cycle regulation of the p34cdc2/p33cdk2-activating kinase p40MO15." *J Cell Sci* **107** (Pt 10): 2789-2799.
- Rand, U., M. Rinas, J. Schwerk, G. Nohren, M. Linnes, A. Kroger, M. Flossdorf, K. Kaly-Kullai, H. Hauser, T. Hofer and M. Koster (2012).** "Multi-layered stochasticity and paracrine signal propagation shape the type-I interferon response." *Mol Syst Biol* **8**: 584.
- Raychaudhuri, S., E. F. Remmers, A. T. Lee, R. Hackett, C. Guiducci, N. P. Burt, L. Gianniny, B. D. Korman, L. Padyukov, F. A. Kurreeman, M. Chang, J. J. Catanese, B. Ding, S. Wong, A. H. van der Helm-van Mil, B. M. Neale, J. Coblyn, J. Cui, P. P. Tak, G. J. Wolbink, J. B. Crusius, I. E. van der Horst-Bruinsma, L. A. Criswell, C. I. Amos, M. F. Seldin, D. L. Kastner, K. G. Ardlie, L. Alfredsson, K. H. Costenbader, D. Altshuler, T. W. Huizinga, N. A. Shadick, M. E. Weinblatt, N. de Vries, J. Worthington, M. Seielstad, R. E. Toes, E. W. Karlson, A. B. Begovich, L. Klareskog, P. K. Gregersen, M. J. Daly and R. M. Plenge (2008).** "Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis." *Nat Genet* **40**(10): 1216-1223.
- Rickert, P., W. Seghezzi, F. Shanahan, H. Cho and E. Lees (1996).** "Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II." *Oncogene* **12**(12): 2631-2640.

- Rothwarf, D. M. and M. Karin (1999).** "The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus." *Sci STKE* **1999**(5): RE1.
- Russo, A. A., L. Tong, J. O. Lee, P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich (1998).** "Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a." *Nature* **395**(6699): 237-243.
- Rzeczkowski, K., K. Beuerlein, H. Muller, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, D. Kettner-Buhrow, H. Holtmann and M. Kracht (2011).** "c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies." *J Cell Biol* **194**(4): 581-596.
- Saab, R., J. L. Bills, A. P. Miceli, C. M. Anderson, J. D. Khoury, D. W. Fry, F. Navid, P. J. Houghton and S. X. Skapek (2006).** "Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 activity arrests proliferation in myoblasts and rhabdomyosarcoma-derived cells." *Mol Cancer Ther* **5**(5): 1299-1308.
- Sabir, M., R. M. Baig, I. Mahjabeen and M. A. Kayani (2012).** "Novel germline CDK4 mutations in patients with head and neck cancer." *Hered Cancer Clin Pract* **10**(1): 11.
- Sakaue-Sawano, A., H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai and A. Miyawaki (2008).** "Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression." *Cell* **132**(3): 487-498.
- Sakurai, H., H. Chiba, H. Miyoshi, T. Sugita and W. Toriumi (1999).** "IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain." *J Biol Chem* **274**(43): 30353-30356.
- Sameer, A. S., S. Abdullah, S. Nissar, R. Rasool, Z. A. Shah, D. Afroze, N. A. Chowdri and M. A. Siddiqi (2012).** "The blues of P(16)INK(4a): aberrant promoter methylation and association with colorectal cancer in the Kashmir valley." *Mol Med Rep* **5**(4): 1053-1057.
- Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres and M. Barbacid (2007).** "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." *Nature* **448**(7155): 811-815.
- Sausville, E. A. (2003).** "Cyclin-dependent kinase modulators studied at the NCI: pre-clinical and clinical studies." *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**(1): 47-56.
- Schachter, M. M., K. A. Merrick, S. Larochelle, A. Hirschi, C. Zhang, K. M. Shokat, S. M. Rubin and R. P. Fisher (2013).** "A Cdk7-Cdk4 T-loop phosphorylation cascade promotes G1 progression." *Mol Cell* **50**(2): 250-260.
- Scheidereit, C. (2006).** "IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription." *Oncogene* **25**(51): 6685-6705.
- Schmitz, M. L. and P. A. Baeuerle (1991).** "The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B." *EMBO J* **10**(12): 3805-3817.
- Schmitz, M. L., M. A. dos Santos Silva, H. Altmann, M. Czisch, T. A. Holak and P. A. Baeuerle (1994).** "Structural and functional analysis of the NF-kappa B p65 C terminus. An acidic and modular transactivation domain with the potential to adopt an alpha-helical conformation." *J Biol Chem* **269**(41): 25613-25620.
- Schmitz, M. L., I. Mattioli, H. Buss and M. Kracht (2004).** "NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels." *Chembiochem* **5**(10): 1348-1358.
- Schmitz, M. L., A. Weber, T. Roxlau, M. Gaestel and M. Kracht (2011).** "Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines." *Biochim Biophys Acta* **1813**(12): 2165-2175.
- Schmitz, N. M., A. Hirt, M. Aebi and K. Leibundgut (2006).** "Limited redundancy in phosphorylation of retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin-dependent kinases in acute lymphoblastic leukemia." *Am J Pathol* **169**(3): 1074-1079.
- Schreiber, J., R. G. Jenner, H. L. Murray, G. K. Gerber, D. K. Gifford and R. A. Young (2006).** "Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5899-5904.
- Senderowicz, A. M. (2003).** "Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators." *Oncogene* **22**(42): 6609-6620.

- Serrano, M., G. J. Hannon and D. Beach (1993).** "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." *Nature* **366**(6456): 704-707.
- Sherr, C. J. (1994).** "G1 phase progression: cycling on cue." *Cell* **79**(4): 551-555.
- Sherr, C. J. (1996).** "Cancer cell cycles." *Science* **274**(5293): 1672-1677.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995).** "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." *Genes Dev* **9**(10): 1149-1163.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999).** "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-1512.
- Shinozaki, H., S. Ozawa, N. Ando, H. Tsuruta, M. Terada, M. Ueda and M. Kitajima (1996).** "Cyclin D1 amplification as a new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information." *Clin Cancer Res* **2**(7): 1155-1161.
- Shirakabe, K., K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, S. Matsuda, T. Moriguchi, Y. Gotoh, K. Matsumoto and E. Nishida (1997).** "TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase." *J Biol Chem* **272**(13): 8141-8144.
- Solt, L. A. and M. J. May (2008).** "The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling." *Immunol Res* **42**(1-3): 3-18.
- Soos, T. J., H. Kiyokawa, J. S. Yan, M. S. Rubin, A. Giordano, A. DeBlasio, S. Bottega, B. Wong, J. Mendelsohn and A. Koff (1996). "Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle." *Cell Growth Differ* **7**(2): 135-146.
- Sotillo, R., J. F. Garcia, S. Ortega, J. Martin, P. Dubus, M. Barbacid and M. Malumbres (2001).** "Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13312-13317.
- Sparmann, A. and D. Bar-Sagi (2004).** "Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis." *Cancer Cell* **6**(5): 447-458.
- Stephens, R. M., N. R. Rice, R. R. Hietsch, H. R. Bose, Jr. and R. V. Gilden (1983).** "Nucleotide sequence of v-rel: the oncogene of reticuloendotheliosis virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(20): 6229-6233.
- Sutcliffe, E. L., K. L. Bunting, Y. Q. He, J. Li, C. Phetsouphanh, N. Seddiki, A. Zafar, E. J. Hindmarsh, C. R. Parish, A. D. Kelleher, R. L. McInnes, T. Taya, P. J. Milburn and S. Rao (2011).** "Chromatin-associated protein kinase C-theta regulates an inducible gene expression program and microRNAs in human T lymphocytes." *Mol Cell* **41**(6): 704-719.
- Swanton, C., D. J. Mann, B. Fleckenstein, F. Neipel, G. Peters and N. Jones (1997).** "Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins." *Nature* **390**(6656): 184-187.
- Tanaka, T., M. J. Grusby and T. Kaisho (2007).** "PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF- κ B activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit." *Nat Immunol* **8**(6): 584-591.
- Taniguchi, Y., J. W. Pippin, H. Hagmann, R. D. Krofft, A. M. Chang, J. Zhang, Y. Terada, P. Brinkkoetter and S. J. Shankland (2012).** "Both cyclin I and p35 are required for maximal survival benefit of cyclin-dependent kinase 5 in kidney podocytes." *Am J Physiol Renal Physiol* **302**(9): F1161-1171.
- Tassan, J. P., S. J. Schultz, J. Bartek and E. A. Nigg (1994).** "Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase)." *J Cell Biol* **127**(2): 467-478.
- Thomas, N. S., A. R. Pizzey, S. Tiwari, C. D. Williams and J. Yang (1998).** "p130, p107, and pRb are differentially regulated in proliferating cells and during cell cycle arrest by alpha-interferon." *J Biol Chem* **273**(37): 23659-23667.
- Toogood, P. L., P. J. Harvey, J. T. Repine, D. J. Sheehan, S. N. VanderWel, H. Zhou, P. R. Keller, D. J. McNamara, D. Sherry, T. Zhu, J. Brodfuehrer, C. Choi, M. R. Barvian and D. W. Fry (2005).** "Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6." *J Med Chem* **48**(7): 2388-2406.
- Traganos, F. (2004).** "Cycling without cyclins." *Cell Cycle* **3**(1): 32-34.

- van Loo, G. and R. Beyaert (2011).** "Negative regulation of NF-kappaB and its involvement in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **13**(3): 221.
- Vanden Berghe, W., L. Vermeulen, G. De Wilde, K. De Bosscher, E. Boone and G. Haegeman (2000).** "Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6." Biochem Pharmacol **60**(8): 1185-1195.
- Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue and Z. J. Chen (2001).** "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." Nature **412**(6844): 346-351.
- Wang, W., G. Zhou, M. C. Hu, Z. Yao and T. H. Tan (1997).** "Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction." J Biol Chem **272**(36): 22771-22775.
- Wang, Y. and T. D. Gilmore (2001).** "LIM domain protein Trip6 has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains." Biochim Biophys Acta **1538**(2-3): 260-272.
- Waugh, D. J. and C. Wilson (2008).** "The interleukin-8 pathway in cancer." Clin Cancer Res **14**(21): 6735-6741.
- Weber, A., P. Wasiliew and M. Kracht (2010).** "Interleukin-1 (IL-1) pathway." Sci Signal **3**(105): cm1.
- Weinberg, R. A. (1995).** "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-330.
- Weiss, C., S. Schneider, E. F. Wagner, X. Zhang, E. Seto and D. Bohmann (2003).** "JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun." EMBO J **22**(14): 3686-3695.
- Werner, S. and R. Grose (2003).** "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev **83**(3): 835-870.
- Westphal, M., M. Hansel, W. Hamel, R. Kunzmann and F. Holzel (1994). "Karyotype analyses of 20 human glioma cell lines." Acta Neurochir (Wien) **126**(1): 17-26.
- Wiedemeyer, W. R., I. F. Dunn, S. N. Quayle, J. Zhang, M. G. Chheda, G. P. Dunn, L. Zhuang, J. Rosenbluh, S. Chen, Y. Xiao, G. I. Shapiro, W. C. Hahn and L. Chin (2010).** "Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11501-11506.
- Wietek, C. and L. A. O'Neill (2007).** "Diversity and regulation in the NF-kappaB system." Trends Biochem Sci **32**(7): 311-319.
- Willier, S., E. Butt, G. H. Richter, S. Burdach and T. G. Grunewald (2011).** "Defining the role of TRIP6 in cell physiology and cancer." Biol Cell **103**(12): 573-591.
- Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer zum Buschenfelde and D. Beach (1995).** "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." Science **269**(5228): 1281-1284.
- Yang, P., L. Guo, Z. J. Duan, C. G. Tepper, L. Xue, X. Chen, H. J. Kung, A. C. Gao, J. X. Zou and H. W. Chen (2012).** "Histone methyltransferase NSD2/MMSET mediates constitutive NF-kappaB signaling for cancer cell proliferation, survival, and tumor growth via a feed-forward loop." Mol Cell Biol **32**(15): 3121-3131.
- Yu, J. X., Y. L. Meng and Y. Li (2010).** "[Levels of P27Kip1 expression and apoptosis in HL-60 cells after treatment with TGF-ss1 and/or arsenic trioxide]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **18**(4): 893-897.
- Zambon, A. C., S. Gaj, I. Ho, K. Hanspers, K. Vranizan, C. T. Evelo, B. R. Conklin, A. R. Pico and N. Salomonis (2012).** "GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation." Bioinformatics **28**(16): 2209-2210.
- Zarkowska, T., S. U, E. Harlow and S. Mitnacht (1997).** "Monoclonal antibodies specific for underphosphorylated retinoblastoma protein identify a cell cycle regulated phosphorylation site targeted by CDKs." Oncogene **14**(2): 249-254.
- Zhang, G. and S. Ghosh (2001).** "Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity." J Clin Invest **107**(1): 13-19.

Zhang, H., G. J. Hannon and D. Beach (1994). "p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states." Genes Dev **8**(15): 1750-1758.

Zhang, L., F. B. Fried, H. Guo and A. D. Friedman (2008). "Cyclin-dependent kinase phosphorylation of RUNX1/AML1 on 3 sites increases transactivation potency and stimulates cell proliferation." Blood **111**(3): 1193-1200.

Ziesche, E., D. Kettner-Buhrow, A. Weber, T. Wittwer, L. Jurida, J. Soelch, H. Muller, D. Newel, P. Kronich, H. Schneider, O. Dittrich-Breiholz, S. Bhaskara, S. W. Hiebert, M. O. Hottiger, H. Li, E. Burstein, M. L. Schmitz and M. Kracht (2013). "The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF-kappaB." Nucleic Acids Res **41**(1): 90-109.

Zou, X., D. Ray, A. Aziyu, K. Christov, A. D. Boiko, A. V. Gudkov and H. Kiyokawa (2002). "Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence." Genes Dev **16**(22): 2923-2934.

Zuo, L., J. Weger, Q. Yang, A. M. Goldstein, M. A. Tucker, G. J. Walker, N. Hayward and N. C. Dracopoli (1996). "Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma." Nat Genet **12**(1): 97-99.

9. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	n	nano-
AA	Acrylamid	Nr	Nummer
Abb.	Abbildung	OD	optische Dichte
APS	Ammoniumperoxodisulfat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
as	<i>antisense</i>	PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
AS	Aminosäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ATP	Adenosintriphosphat	pH	<i>potentia hydrogenii</i>
bp	Basenpaare	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
BSA	Rinder-Serumalbumin	PVDF	Polyvinylidenfluorid
bzw.	beziehungsweise	qPCR	Quantitative Real-Time PCR
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
Da	Dalton	RT	Reverse Transkription/Raumtemperatur
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid	se	<i>sense</i>
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	sek	Sekunde
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	s.e.m.	<i>standard error of the mean</i>
dNTPs	<i>Desoxynucleotidtriphosphate</i>	Ser	Serin
DTT	Dithiothreitol	sh	<i>short hairpin</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>	Tab.	Tabelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>	TBS	Trisgepufferte Salzlösung
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent assay</i>	TBST	TBS mit Tween20
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>	TE	Tris-EDTA
f.c.	<i>final concentration</i>	TEMED	N, N', N'-Tetramethylendiamin
FKS	Fötales Kälberserum	TNF	Tumor Nekros Faktor
g	Gramm	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
GFP	<i>Green flurescent protein</i>	U	Units; Enzymeinheit
GST	Glutation-S-Transferase	UV	Ultraviolett
GTP	Guanosintriphosphat	V	Volt
h	Stunde/n	v/v	Volumen pro Volumen
HEPES	N-2Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfon-säure	wt	Wildtyp
IF	Indirekte Immunfluoreszenz	w/v	Gewicht pro Volumen
IL	Interleukin	x g	Erdbeschleunigung
IgG	Immunglobulin G	d.h.	das heißt
k	Kilo	z.B.	zum Beispiel
kb	Kilobasen	α-	anti-
l	Liter	μ	Mikro-
LB	<i>lysogeny broth</i>	°C	Grad Celsius
M	Molar		
min	Minute/n		
m	milli-		
mRNA	<i>messenger RNA</i>		

10. Anhang

Tabelle 15: Identifizierung neuer CDK6-Substrate. Stabile HeLa Kontrollzellen (Vektor) und HeLa-pS-shCDK6-K06-Zellen (shCDK6) wurden für 48 h durch Serumentzug arretiert (arrest). Ein Teil der Zellen wurde durch Zugabe von 20% FKS für 6 h in den Zellzyklus entlassen und anschließend für 1 h mit IL-1 stimuliert (G1 release + IL-1). Die Zellen wurden wie unter 3.1.19 beschrieben behandelt und analysiert. Gezeigt sind die Ratios für 124 Genprodukte, von denen mindestens ein Peptid durch G1 release plus IL-1 oder im CDK6 Knockdown in mindestens einer Bedingung $\geq 1,9$ fach reduziert war. In einer zusätzlichen Spalte sind alle Peptide mit den identifizierten posttranslationalen Modifikationen aufgelistet.

Legende: * - Phosphorylierung, # - oxidiertes Methionin, § - bekannte Stelle

S*P oder T*P- mögliche CDK Phosphorylierungsstellen in rot oder orange markiert; zusätzliche Phosphorylierungsstellen in hellgrün markiert

A= arrest (shCDK6) / Vektor; B= G1 release + IL-1 / Vektor; C= G1 release + IL-1 (shCDK6) / Vektor

Nr.	A	B	C	Genname	phosphorylierte AS	phosphoryliertes Peptid
1	1.56	2.21	1.11	ACSL4	57	AKPTSDKPGS*PYR
2	-1.40	-3.21	1.75	ADAR	491 493	AIM#EMPSFYSHGLPRCS*PYKK, AIM#EM#PSFYSHGLPRCSPY*KK
3	-1.50	2.48	-1.03	ADNP	§409	YSLQSANASSLSSGQLKS*PSLSQSQASR
4	3.07	4.03	1.10	AHNAK	§5077; §2397	VDVKS*PK, ISMPDLHLKLS*PK
5	2.25	3.67	1.57	AHNAK2	§3408	VDLKS*PQVDIKGPK
6	-2.52	-5.56	1.36	ALX4	32	EGSS*PFRAFPGGDKFGTTFLSAAAK
7	4.61	6.22	-3.57	ARID5A	503, 514	GT*MLHCPLNFTGT*PGPLK
8	1.41	2.65	1.23	ATAD2	§336, §342 §337, §342 §337, 344	LS*SAGPRS*PYCK, LS*AGPRS*PYCK, LSS*AGPRSPY*CK
9	1.23	-2.24	2.25	BAD	§91	HSSYPAGTEDDEGMGEEPS*PFRGR
10	-1.07	-2.57	1.26	BIRC6	§577	EKHQEQHNIPFCLLAGLLTYKS*PATSPISSNSHR
11	-1.06	3.99	1.18	C10orf47	§212, 214 §212, §215	MAGNEALS*PT*SPFREGRPGEWR, MAGNEALS*PTS*PFREGRPGEWR
12	-3.73	1.15	-4.40	C15orf39	322	GTGYQAGGLGS*PYLR
13	1.41	2.95	1.20	C2orf49	§189, §193 §189, §197 §189, §198	KSPSGPVKS*PPLS*PVGTTPVK, KSPSGPVKS*PPLSPVGT*TPVK, KSPSGPVKS*PPLSPVGT*PVK
14	-1.65	1.51	-2.31	CBX6	151	RPLPRPDPQGGSPGLRPPIS*PFSETVR
15	-1.11	2.03	-1.43	CCDC165	§612 §613 §612, §613	DHAPSIPT*SPFGDSLESSTELR, DHAPSIPT*SPFGDSLESSTELR, EGPGRDHAPSIPT*SPFGDSLESSTELRR
16	-2.15	1.62	-2.14	CCDC6	393, 406 393, §413 395, 410	AGMSYY*NSPGLHVQHMGTS*HGITRPSR, AGMSYY*NSPGLHVQHMGTS*HGITRPS*PR, AGMSYYNS*PGLHVQHMGTS*HGITRPSR
17	-1.73	1.06	-2.06	CDC25C	§212 §214 §216	SGLYRSPSM#PENLNRPR, SGLYRS*PSM#PENLNRPR, SGLYRSPS*MPENLNRPR
18	-1.35	4.49	-1.46	CDK11A; CDK11B	§65, §72 67, §72	NS*PYRREDS*MEDRGEEDDSLAIKPPQQMSR, NSPYRREDS*MEDRGEEDDSLAIKPPQQMSR
19	1.68	2.07	-1.17	CDK13	§413, 416, 420, 424	SR*PYS*SRHS*RSRS*R
20	-4.09	-1.18	-3.26	CHAF1A	309, 314 309, 315 §310, 314 §310, 315 309, 316 §310, 316	QHSST*SPFPT*STPLRR, QHSST*SPFPT*STPLRR, QHSST*SPFPT*STPLRR, QHSST*SPFPT*STPLRR, QHSST*SPFPT*STPLRR, QHSST*SPFPT*STPLRR, QHSST*SPFPT*STPLRR
21	-2.17	-3.26	-1.07	CHD1	§1673, 1683 1683, 1694, 1699 1683, 1704	ASSS*GPRSPLDQRS*PYGSR, SPLDQRS*PYGSRSPFEHS*VEHKS*TPEHTWSSR, SPLDQRS*PYGSRSPFEHSVEHKSTPEHT*WSSR
22	1.09	3.74	1.07	CIC	1149 1150	GPPAPATATPAPT*SPFPSATAGSM#TYSLVAPK, GPPAPATATPAPT*SPFPSATAGSM#TYSLVAPK
23	-1.95	-1.90	-4.35	CNOT4	§324	SNPVIPISSSNHSARS*PFEGAVTESQSLFSDNFR
24	-1.38	-2.18	1.07	CRTC1	137 139	QADSCPYGTM#YLS*PPADTSWRR, QADSCPYGTM#YLS*PPADTSWRR
25	-1.44	-1.98	1.09	CRTC2	131 134	HIDSSPY*PAYLSPPESSWRR, HIDSSPY*PAYLSPPESSWRR,

					\$136	HIDSSPYSPAYLS*PPPESSWRR
26	6.14	2.60	1.30	CTAGE5	\$517, \$522	EHS*PYGPS*PLGWPSSETR
27	-1.12	-2.64	1.06	CTTNBP2NL	\$560 \$568 \$570 \$523, 526 \$523, \$527	GDTSHSPTPGKVSSPLS*PLSPGIKSPTIPR, GDTSHSPTPGKVSSPLSPLSPGIKS*PTIPR, GDTSHSPTPGKVSSPLSPLSPGIKSPT*IPR, FTSQGPIKPV*S*PNS*SPFGTDYR, FTSQGPIKPV*S*PNS*PFGTDYR
28	1.17	1.99	-1.06	DAG1	\$888	NMTPYRS*PPYVPP
29	-2.93	-1.10	-2.50	DBNL	\$269, \$274, \$283 \$269, \$275, \$283 \$270, \$274, \$283 \$269, \$272, \$283	AM#*STTSIS*SPQPGKLR*S*PFLQK, AM#*STTSISS*PQPGKLR*S*PFLQK, AM#*ST*TSIS*SPQPGKLR*S*PFLQK, AM#*TT*ISSPQPGKLR*S*PFLQK
30	-2.01	-2.71	1.37	DCP1A	\$62 \$64	SAS*PYHGFTIVNR, SASP*YHGFTIVNR
31	1.30	1.26	-3.86	DENND4A	\$1240	ACDDKLNKKS*PLVVK
32	-2.01	-2.17	-1.60	DENND4C	\$505	LCFSRHPTGNSITKS*PPLMAK
33	2.16	5.29	-1.54	DHX33	61	QQPLAQPSAS*PYPEAVELQR
34	-1.39	1.02	-2.12	EIF3B	237 \$239	GYIFLEY*ASPAHAVDAVK, GYIFLEYAS*PAHAVDAVK
35	-2.08	1.14	-1.94	ELF1	376 378	TVQPTQS*PYPTQLFR, TVQPTQSPY*PTQLFR
36	1.17	4.41	-1.60	ETV3	\$245 \$245, \$250	PGM#YDPHS*PFAVSPIPGR, RKPDIM#LPLFARPGM#YDPHS*PFAVS*PIPIGR
37	-1.37	3.54	-2.66	FAM21A; FAM21B; FAM21C	\$441; \$352	KS*PYGPPPTGLFDDDDGDDDDFFSAPHKPSK, LTDEDF*S*PFGSGGLFSGGK
38	-2.02	-1.36	-2.72	FAM21C; FAM21D	1092; 81 1093; 81	AASGEDSTEEALAAAAAPWEGGPVPGVDT*SPFAK, AASGEDSTEEALAAAAAPWEGGPVPGVDT*S*PFAK
39	-3.42	-2.26	-3.85	FCHSD2	\$659, 669 664, 667 664, 669 \$665, 667 \$665, 669 667, 669	EIQISPSPKPHASLPLPLY*DQPPSSPY*S*PDKR, EIQISPSPKPHASLPLPLYDQPPS*SPY*PSPDKR, EIQISPSPKPHASLPLPLYDQPPS*SPYPS*PDKR, EIQISPSPKPHASLPLPLYDQPPS*PY*PSPDKR, EIQISPSPKPHASLPLPLYDQPPS*PYPS*PDKR, EIQISPSPKPHASLPLPLYDQPPSSPY*PS*PDKR
40	-1.77	-1.22	-2.02	FLNA	\$1533 1055	EGPYSIVLYGDEEVPRS*PFKVK, FLPREEGPYEVEVTYDGVVPGS*PFPLEAVAPTSPK
41	-2.05	-1.11	-2.38	FLNB	\$2465 \$1505	YGGPNHIVGS*PFKAK, YADEEIPRS*PFKVK
42	-1.77	4.38	-2.06	GAB2	\$543	NNTVIDELPFKS*PITK
43	-1.42	1.04	-1.97	GATAD2A	\$598	KTPLSTGGTLAFVS*PSLAVHK
44	4.80	1.99	1.87	GPRC5A	\$345 \$347	AHAWPS*PYKDYEVK AHAWPSY*DYEVKK
45	9.28	2.37	8.19	HIST1H1B	187 \$189	KAT*KSPAKPK KATKS*PAKPK
46	19.59	9.43	1.26	HIST1H1E	\$187	KAPKS*PAKAK
47	-2.65	-1.15	-2.72	HOMEZ	\$351	VGPT EYL*S*PDM#QR
48	-1.87	-1.93	-1.30	KIAA0182	710	ASLPPAATFGELSGPLKPGS*PYRPPVPR
49	1.11	-2.26	1.04	KIAA0889	\$1017	VYYS*PPVAR
50	-1.19	-2.29	1.53	KIF13B	\$1644	ERPDLEAPAGS*PFRVR
51	-2.82	-1.05	-2.62	KIF20A	\$857, 862 \$857, 863 \$857, 864 \$857, \$867 \$857, \$869	NLLPRT*PTCQS*STDCSPYAR, NLLPRT*PTCQSS*STDCSPYAR, NLLPRT*PTCQSS*STDCSPYAR, NLLPRT*PTCQSS*STDCSPYAR, NLLPRT*PTCQSS*STDCSPYAR, NLLPRT*PTCQSS*STDCSPYAR
52	3.44	6.43	-1.14	LARP4B	\$736	EQSTPPKS*PQ
53	1.14	3.71	1.08	LMO7	\$988, \$990 \$988, \$991 \$988, \$995 \$990, \$991 \$990, \$995 \$988, \$994 \$990, \$994	EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK, EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK, EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK, EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK, EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK, EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK, EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK, EVAATEEDVTRLPS*PT*SPFSSLSQDQAATSK
54	-1.09	1.92	2.65	LMTK2	1397 1399	ELGPCGGEACGPDLGSPAPASGS*PYLSR, ELGPCGGEACGPDLGSPAPASGS*PYLSR
55	-1.83	-3.09	-	LOC1001327 13	916, 927	SLYES*PSM#EVPYGS*MEVPLWKSPVEVPK
56	17.83	8.07	2.06	LPAR5	313	GLGT*PHRAR
57	-1.48	-3.85	-1.72	MAPT	\$713, \$721 \$713, \$717, \$721 \$717, \$720, \$721 \$713, \$720, \$721 \$713 \$713, \$717, \$720 \$711, \$717, \$721	AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR, AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR, AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR, AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR, AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR, AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR, AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR, AKTDHGAEIVYS*PVVSGDTS*PR
58	-3.42	-5.00	-1.11	MSH6	\$14	QSTLYSFFPKS*PALSDANKASAR

					§970, §973, §988, §990 §972, §973, §983, §990 §972, §973, §988, §992 §972, §973, §988, §994 §972, §973, §990, §996	YSHS*GSS*SPDTKVKPETPPRQS*HS*GSISPYPKVK, YSHSGS*S*SPDTKVKPET*PPRQSHS*GSISPYPKVK, YSHSGS*S*SPDTKVKPETPPRQS*HSGS*ISPYPKVK, YSHSGS*S*SPDTKVKPETPPRQS*HSGSIS*PYPKVK, YSHSGS*S*SPDTKVKPETPPRQSHS*GSISPY*PKVK
89	2.04	3.10	-1.01	SRSF9	§204 §204, 206, §214 §204, §208, §214 §204, §211, §214 §204, §211, §216 206, §211, §216 §204, 206, §221 §204, §208, §216 §204, §208, §221 §204, §211, §221 §208, §211, §221 §197, §199, 206, §216 §197, §204, §211, §216 §199, §204, 206, §216 §199, §204, §211	GRDS*PYQSR, GRDS*PY*QSRGSPHY*FSPFRPY, GRDS*PYQS*RGSPHY*FSPFRPY, GRDS*PYQSRGS*PHY*FSPFRPY, GRDS*PYQSRGS*PHYFS*PFRPY, GRDSPY*QSRGS*PHYFS*PFRPY, GRDS*PY*QSRGSPHYFSPFRPY*, GRDS*PYQS*RGSPHYFS*PFRPY, GRDS*PYQS*RGSPHYFSPFRPY*, GRDS*PYQSRGS*PHYFSPFRPY*, GRDSPYQS*RG*PHYFSPFRPY*, S*GS*RGRDSPY*QSRGSPHYFS*PFRPY, S*GSRGRDS*PYQSRGS*PHYFS*PFRPY, SGS*RGRDS*PY*QSRGSPHYFS*PFRPY, SGS*RGRDS*PYQSRGS*PHYFSPFRPY
90	1.24	2.01	2.26	SSFA2	§864, §869, 883	T*LSTHS*VPNISGATCSAFAS*PFGCPYSHR
91	-3.48	-1.16	-3.62	SUGT1	§279 §281	NLYPS*SSPYTR NLYPSS*PYTR
92	-1.81	1.08	-4.68	SYNJ1	1441	AKSEESEATSWFSKEEPVTIS*PFPSLQPLGHNK
93	-1.46	-1.56	-2.06	TBC1D24	§480	HPELTKPPLM#AAEPTAPLSHSASSDPADRLS*PFLAAR
94	-1.27	1.43	-1.92	TBCE	493 §495	LLKVPVSDLLLSY*ESPCKPGR LLKVPVSDLLLSYES*PKKPGR
95	-4.10	1.48	-2.60	TCF12	§302, §307 §305, §307 §305, §313	GST*SSSPY*VAASHTPPINGSDSILGTR, GSTSS*PY*VAASHTPPINGSDSILGTR, GSTSS*PYVAASHT*PPINGSDSILGTR
96	1.44	2.16	-1.28	TCOF1	§381	TSQVGAASAPAKES*PR
97	-1.40	-2.22	1.88	THRAP3	§237, §243, §253 §237, §248, §253 §237, §240, §248 §243, §248, §253	AS*AVSELS*PRERSPALKS*PLQSVVVR, AS*AVSELS*PRERS*PALKS*PLQSVVVR, AS*AVS*ELSPRERS*PALKS*PLQSVVVR, ASAVSELS*PRERS*PALKS*PLQSVVVR
98	-1.37	2.76	-1.50	TMEM209	§198 201 203	LASFSPS*PPSPYPTTVGVPVSSGLR, LASFSPSPS*PYPTTVGVPVSSGLR, LASFSPSPSPY*PTTVGVPVSSGLR
99	-1.19	-1.91	1.54	TMPO	§424	IDQSKFQETEFLS*PPRKVPR
100	-1.02	-2.25	-1.43	TNRC18	§611	DAVAVRPGGCGKKS*PFGGLGTMKPEAPTSAGASR
101	-1.64	-2.54	-1.58	TNRC6B	§628	GG*PYNQFDIIPGDTLGGHTGPAGDSWLPKSPPTNK
102	-1.56	-2.38	1.65	TNS1	§794	YS*PYDYQCLAGPNQDFHSK
103	-2.82	-1.01	-3.51	TPX2	§486	VLPTVPKS*PAFALK
104	-1.34	-1.01	-1.93	TRIP4	385 387	SSEEPLGVLVNPNM#Y*QSPQWVDHTGAASQKK, SSEEPLGVLVNPNM#YQS*PPQWVDHTGAASQKK
105	-5.95	3.51	-10.85	TRIP6	149 §153 135, 147 135, §153 §142, 147 §142, 149 §142, §153 §142, 156	TGSLKPNPASPLPASP*GGPTPASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGSLKPNPASPLPASP*GGPT*PASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGS*LKNPASPLPAS*PYGGPTPASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGS*LKNPASPLPASP*GGPT*PASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGSLKPNPAS*PLPAS*PYGGPTPASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGSLKPNPAS*PLPAS*PYGGPTPASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGSLKPNPAS*PLPAS*PYGGPT*PASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGSLKPNPAS*PLPAS*PYGGPT*PASYTTASTPAGPAFPVQVK, TGSLKPNPAS*PLPAS*PYGGPT*PASYTTASTPAGPAFPVQVK
106	-2.41	-1.20	-8.53	TROAP	§307, §324	DSHDSHLM#PS*PAPVAQPLGHVPCPS*PFGR
107	-2.00	-2.28	-1.76	TSC1	§505	GGFDS*PFYR
108	1.66	2.72	-1.13	TSPAN32	160, 163	KS*PFS*R
109	-2.05	1.43	-1.92	TUT1	133, 138	EQKEFQS*PASKS*PK
110	3.11	4.26	-3.25	UBAP2	630	SVHNRIPYQS*PVSSSESAPGTIMNGHGGGR
111	-1.02	1.33	-2.00	UBAP2L	§416	NPSDSAVHS*PFTKR
112	-1.39	45.50	-2.01	USP10	§208, §226 §211, §226 §215, §226 §216, §226 §226	T*CNQPQNSTDSVSDIVPDS*PFFGALGSDTR, TCNS*PQNSTDSVSDIVPDS*PFFGALGSDTR, TCNSPQNS*TDSVSDIVPDS*PFFGALGSDTR, TCNSPQNST*DSVSDIVPDS*PFFGALGSDTR, TCNSPQNSTDSVSDIVPDS*PFFGALGSDTR
113	1.13	10.01	1.05	USP54	603	KHCGYTQLS*PFSEDSAK
114	2.76	3.81	1.32	USPL1	1026 1028 1030	QDHNY*CSPTKKNPCEVQPDSLTTNACVR, QDHNYCS*PTKKNPCEVQPDSLTTNACVR, QDHNYCSPT*KKNPCEVQPDSLTTNACVR
115	-2.72	2.91	-3.27	WDR47	§285, §297 §289, §296 §289, §297 §292, §297 §294, §296 §292	AAADLLT*PLISKLS*PYPS*PM#R, AAADLLT*PLIS*KLSPYPS*SPM#R, AAADLLT*PLIS*KLSPYPS*PM#R, AAADLLT*PLISKLS*PYPS*PM#R, AAADLLT*PLISKLS*PYPS*SPM#R, AAADLLT*PLISKLS*PYPS*PM#R
116	-3.30	1.17	-2.22	WWC3	896	ARGS*PFVR

117	-1.07	-1.57	-1.97	ZC3H13	§372	SAS*PYPSHLSLSSPQR
118	1.06	2.45	-2.42	ZC3H14	§274	LCEPEVLNSLEETY*S*PFFR
119	-1.62	1.00	-2.12	ZC3H4	§1299 §1267, §1286 §1265, §1267	GFDPTAS*PFCQ, TGS*GSPFAGNSPAREGEQDAAS*LKDVFKGFDPTAS*PFCQ, T*GS*GSPFAGNSPAREGEQDAASLKDVFVKGFDPTAS*PFCQ
120	-2.39	-7.38	1.98	ZCCHC24	§93, §97 §93	GAS*PYGS*LNNIADGLSSLTEHFSDLTLTSEAR, GAS*PYGSLNNIADGLSSLTEHFSDLTLTSEAR
121	-1.23	-2.14	1.67	ZNF318	§214	YISQEEGPLS*PFLGQLDEYRDK
122	-1.45	-1.14	-1.92	ZNF462	171	NFSCQFCTYKS*PR
123	1.56	1.93	-1.10	ZNF609	§758	AEEGKS*PFRESSGDGMK
124	2.51	2.08	1.3	ZNF828	§108	NQLNKETDPVK*S*PPLPEHQKIPCNSAEPK

11. Danksagung

Herzlichen Dank an **Herrn Prof. Dr. Michael Kracht** für die Überlassung des interessanten Themas, die motivierende Betreuung, die Begutachtung dieser Arbeit und für sein generelles großes Engagement zum Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. H. Dammann danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit, sowie für die kompetente Betreuung und die Vertretung vor dem Fachbereich 08, Biologie und Chemie der Justus Liebig Universität Gießen.

Herrn Prof. Dr. M. L. Schmitz danke ich für hervorragende Zusammenarbeit, sowie für die Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. A. Bindereif danke ich für die freundliche Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Ganz ausdrücklich bedanke ich mich bei **Heike Schneider** und **Dr. Oliver Dittrich-Breiholz** bei der Durchführung der Microarray-Experimente.

Außerdem geht ein riesen Dankeschön an alle **Mitarbeiter des Rudolf-Buchheim-Institutes für Pharmakologie** der Justus Liebig Universität Gießen, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den vielseitigen Rat und die enorme Hilfsbereitschaft, besonders während der Revision, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein ganz besonderer Dank geht an **Helmut Müller** für seine kompetente und zuverlässige Unterstützung zu jeder Zeit.

Vielen Dank auch an meine **Mutter** für ihre Unterstützung während meiner Promotion und meines Lebens.

Von Herzen bedanke ich mich bei **Andi** für sein unendliches Verständnis und seine Hilfsbereitschaft in jeder Hinsicht. Danke, dass du immer für mich da bist.

12. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. 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.

Katja Handschick

13. Publikationen, Präsentationen, Auszeichnungen

Publikationen:

Handschick K¹, Beuerlein K¹, Jurida L¹, Bartkuhn M, Müller H, Soelch J, Weber A, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Scharfe M, Jarek M, Stellzig J, Schmitz ML, Kracht M (2014)

Cyclin-Dependent Kinase 6 is a Chromatin-Bound Cofactor for NF-kappaB-Dependent Gene Expression.

Mol Cell. 2014 Jan 23;53(2):193-208

¹ gleichwertige Autorenschaft

Von den 70 experimentellen Abbildungen der Fig.1-7 und S1-S7 sowie den Tabellen 1-3 in dieser Veröffentlichung sind 45 in dieser Dissertation enthalten.

Buss H¹, **Handschick K¹**, Jurrmann N¹, Pekkonen P¹, Beuerlein K, Müller H, Wait R, Saklatvala J, Ojala PM, Schmitz ML, Naumann M, Kracht M (2012)

Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF-κB p65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression.

PLoS One. 2012;7(12):e51847

¹ gleichwertige Autorenschaft

Jurida L¹, Soelch J¹, Bartkuhn M¹, Müller H, **Handschick K**, Weber A, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Bhujra S, Jarek M, Schmitz ML, Kracht M

Genome wide organization of cytokine-driven enhancers by TAK1-p65 NF-κB-dependent pathways.

¹ gleichwertige Autorenschaft

in Vorbereitung

Präsentationen:

Handschick K, Beuerlein K, Weber A, Müller H, Kracht M

A role of Cyclin-Dependent Kinase 6 (CDK6) in inflammatory gene expression

15th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 07.11.-09.11.2011, Vortrag

Handschick K, Beuerlein K, Kracht M

Cross-talk of cell cycle pathways with inflammatory gene expression through cyclin-dependent kinase 6

77. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Frankfurt/Main, 30.03.-01.04.2011, Posterpräsentation

Auszeichnung:

Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM) Innovation Award for Young Scientists 2011

15th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 07.11.-09.11.2011