

**Die Rolle des AF4 Proteins in der
Transkription
und in der Infektion durch Herpesviren**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. phil. nat.)

vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie der

Johann Wolfgang Goethe Universität

Frankfurt am Main

von

Bastian Scholz

aus Erlensee

Frankfurt am Main, 2013

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der
Johann Wolfgang Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Datum der Disputation: 10.07.2013

Für Beate, Tobias, Julia und Hans-Werner

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	4
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	10
2.1. TRANSKRIPTION	10
2.1.1. ALLGEMEINES	10
2.1.2. DIE PHASEN DER TRANSKRIPTION	11
2.1.3. GENETISCHE ELEMENTE DER TRANSKRIPTION	14
2.1.3.1. Minimalpromotor/Kernpromotor	14
2.1.3.2. Enhancer/Silencer	17
2.1.3.3. Isolatoren/CTCF	20
2.1.4. RNA-POLYMERASEN	21
2.1.4.1. RNA-Polymerase II	22
2.1.5. GENERELLE TRANSKRIPTIONSMASCHINERIE	28
2.1.6. GENERELLE COFAKTOREN - MEDIATOR UND USA-COFAKTOREN	34
2.1.7. P-TEFb	37
2.1.7.1. Allgemeines	37
2.1.7.2. Physiologische Funktion und Auftreten	38
2.1.7.3. P-TEFb als Co-Faktor des HIV-1	41
2.1.7.4. Direkte Regulation von P-TEFb	43
2.1.8. ELONGATIONSFAKTOREN UND ELONGATIONSKOMPLEXE	46
2.1.8.1. TFIIS, TFIIF und ELL	46
2.1.8.2. PAF-Komplex	47
2.1.8.3. SECs	48
2.1.9. EPIGENETISCHE REGULATION DER TRANSKRIPTION	50
2.2. DAS AF4 PROTEIN	52
2.3. HERPESVIREN UND TRANSKRIPTION	57
2.3.1. HUMANES ZYTOMEGALIEVIRUS	57
2.3.1.1. Allgemeines	57
2.3.1.2. IE-Proteine des HCMV	59
2.3.2. EBSTEIN-BARR-VIRUS	60
2.3.2.1. Allgemeines	60
2.3.2.2. Zta und Rta	62
3. ERGEBNISSE	66
3.1. VORARBEITEN	66
3.2. PRODUKTION STABILER ZELLINIEN	68

3.2.1. INDUZIERBARE AF4ST EXPRESSIONSLINIE AUS 293T (TCZP-AF4ST)	68
3.2.2. STABILE AF4 <i>KNOCK-DOWN</i> ZELLINIE AUS HELA ZELLEN (AF4KD V100)	71
3.3. INTERAKTION UND EINFLUSS AUF TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	73
3.4. REGULATION DER P-TEFB ACETYLIERUNG DURCH AF4/AF4N	76
3.5. REKRUTIERUNG VON P-TEFB AUS SPEICHERKOMPLEXEN DURCH AF4/AF4N	80
3.6. VERMEHRUNG ZELLULÄRER RNA DURCH TRANSKRIPTIONSAKTIVIERUNG	87
3.7. AF4 ALS KO-FAKTOR VIRALER IE PROTEINE	89
4. DISKUSSION	98
4.1. INTERAKTION UND AKTIVIERUNG ZWISCHEN AF4 UND P-TEFB	98
4.2. CDK9-ACETYLIERUNG DURCH AF4 UND ABHÄNGIGKEIT VON HDACs	104
4.3. REKRUTIERUNG VON P-TEFB	106
4.4. AF4 ALS KO-FAKTOR DER IE-PROTEINE VON HUMANEN HERPESVIREN	114
5. MATERIAL UND METHODEN	121
5.1. MATERIAL	121
5.1.1. CHEMIKALIEN, GERÄTE UND IHRE BEZUGSQUELLEN	121
5.1.2. PUFFERLÖSUNGEN	125
5.1.3. VERWENDETE ORGANISMEN/MEDIEN	127
5.1.4. SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	128
5.1.5. VEKTOREN UND PLASMIDE	132
5.1.6. ANTIKÖRPER	136
5.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	138
5.2.1. STANDARDMETHODEN	138
5.2.2. SEQUENZANALYSEN	139
5.2.3. QUANTITATIVE PCR (QPCR)	139
5.3. PRODUKTION UND AUFREINIGUNG REKOMBINANTER PROTEINE	140
5.4. ARBEITEN MIT SÄUGERZELLEN	141
5.4.1. TRANSFEKTION	141
5.4.1.1. Transfektion von 293T/ARPE-19 Zellen mittels Polyethylenimin (PEI)	141
5.4.1.2. Transfektion von HeLa/293T Zellen mittels Calciumphosphat	142
5.4.2. MESSUNG DER ZELLPROLIFERATION/WACHSTUMSKURVEN	142
5.4.3. HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN/FRAKTIONEN	142
5.4.4. HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG STABIL AF4-EXPRIMIERENDER ZELLINIEN MITTELS <i>SLEEPING-BEAUTY</i> VEKTORSYSTEM	143
5.4.5. <i>IN-VITRO</i> FLUORESCENZMIKROSKOPIE/DURCHLICHTMIKROSKOPIE	144
5.4.6. LENTIVIRALER <i>KNOCK-DOWN</i> DES AF4 PROTEINS	144
5.4.7. FACS	145
5.4.8. IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE TRANSFIZIERTER ARPE-ZELLEN	146
5.5. BIOCHEMISCHE ARBEITEN	146
5.5.1. <i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNGSVERSUCHE	146
5.5.2. HIV-1/TAR-LUCIFERASE REPORTERGENVERSUCHE	147
5.5.3. ELISA (<i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>)	147

I. Inhaltsverzeichnis

5.5.4. (Co-)IMMUNPRÄZIPITATIONEN (IP)	147
5.5.5. STREP-TACTIN-AFFINITÄTSAUFREINIGUNG VON MPCs	148
5.5.6. P-TEFB-SPEICHERKOMPLEX DISSOZIATIONSVERSUCHE (<i>P-TEFB RELEASE ASSAY</i>)	149
5.5.7. 7SK snRNA-BINDUNGSVERSUCH	149
5.5.8. 7SK snRNA-DEGRADATIONSVERSUCH	150
5.5.9. GLYCEROLGRADIENTEN	151
5.5.10. <i>ALOX5</i> REPORTERGENVERSUCHE	151
5.5.11. CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATIONEN (CHIP)	151
5.5.12. PROTEINFÄRBUNGEN (COOMASSIE/SILBERFÄRBUNG)	153
5.6. DATENANALYSE	153
6. LITERATURVERZEICHNIS	155
7. ANHANG	188
7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	188
7.2. LEBENSLAUF	190
7.3. PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE	191
7.4. DANKSAGUNG	192

II. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1.** Der genetische Informationsfluss und die zyklischen Phasen der Transkription in Eukaryoten
- Abb. 2.1.3.1.** Vereinfachte Promotorstruktur in der eukaryoten Genexpression
- Abb. 2.1.3.2.** Enhancer/Silencer
- Abb. 2.1.4.1.** Modifikation der CTD der RNAP II
- Abb. 2.1.5.** Induktion der Bindung von TFIID an den Kernpromotor - Rolle der GTF
- Abb. 2.1.7.2.** Struktur und Funktion des P-TEFb
- Abb. 2.1.7.2.** P-TEFb Speicherkomplexe und P-TEFb Rekrutierung
- Abb. 2.2.a.** Gen- und Proteinaufbau des humanen AF4
- Abb. 2.2.b.** Der AF4 MPC als Aktivator der Transkription
- Abb. 3.1.** Vorarbeiten
- Abb. 3.2.1.** Charakterisierung der TCZP-AF4ST Zelllinie
- Abb. 3.2.2.** Charakterisierung der AF4kd V100 Zelllinie
- Abb. 3.3.** Interaktion und Einfluss von AF4 auf Transkriptionsfaktoren
- Abb. 3.4.** Regulation der P-TEFb Acetylierung durch AF4/AF4N
- Abb. 3.5.1.** Rekrutierung von P-TEFb aus Speicherkomplexen durch AF4/AF4N
- Abb. 3.5.2.** P-TEFb Rekrutierung und Errichtung von AF4-P-TEFb Komplexen
- Abb. 3.5.3.** *in vitro* Fluoreszenzmikroskopie der P-TEFb Rekrutierung
- Abb. 3.6.** Erhöhung der zellulären RNA Menge durch Transkriptionsaktivierung
- Abb. 3.7.1.** Reportergenversuche zur Identifizierung mit AF4 kooperierender viraler IE Proteine
- Abb. 3.7.2.** Stabilisierung des AF4-MPCs in Anwesenheit viraler IE Proteine
- Abb. 3.7.3.** Funktionelle Interaktion zwischen AF4 und viralen IE Proteinen

1. Zusammenfassung

Die Transkription ist ein entscheidender Schritt in der Transition der genetischen Information, welche durch die DNA codiert und im Genom hinterlegt ist, zu dreidimensionalen Funktionseinheiten in der Zelle, den Proteinen. Während der Transkription wird die Information von der Ebene der DNA in RNA umgewandelt, welche in der Zelle zusätzlich zu dessen Rolle als Informationsmediator in Form der mRNA eine Vielzahl von Funktionen ausübt. Die Transkription benötigt in Hinblick auf ihre essentielle Rolle in der Errichtung des Proteoms und der notwendigen Adaption von Genexpressionsprogrammen an externe zelluläre Stimuli, den Zellzyklus etc. eine präzise und gleichzeitig flexible Regulation. Besonders für die Transkription von mRNA dient die eukaryotische RNA-Polymerase II (RNAP II) in diesem Prozess als eine zentrale Einheit, die einer Vielzahl regulativer Mechanismen wie post-translationaler Modifikationen und der Assemblierung dynamischer Proteinkomplexe unterliegt. Während Komponenten dieser Regulation wie die Zusammensetzung und Dynamik des Prä-Initiationskomplex bereits seit Jahrzehnten beschrieben sind, ist eine besondere Form der RNAP II-abhängigen Regulation erst in den letzten Jahren Gegenstand genauerer Untersuchungen geworden. So erfährt die RNAP II bei einer Vielzahl von Genen unmittelbar nach der Initiation einen Arrest, der das Enzym nicht weiter über die DNA prozessieren lässt und somit die produktive Elongation des Gens blockiert. Die Aufhebung dieser Blockade wird durch den positiven Transkriptions-elongationsfaktor b (P-TEFb) dominiert, der durch distinkte post-translationale Modifikationen der C-terminalen Domäne der RNAP II und assoziierter Faktoren die produktive Elongation ermöglicht. P-TEFb selbst unterliegt dabei einer strengen Regulation durch eine inaktivierende Assoziation mit Speicherkomplexen. P-TEFb wurde abseits dieser Komplexe in einer Vielzahl von Elongations-assoziierten Proteinkomplexen identifiziert, der Mechanismus der Transition aus dem inaktiven Speicherkomplex zur aktiven Form an der RNAP II war jedoch unbekannt. Ein zentrales Element aller aktiven Komplexe ist die Anwesenheit von Proteinen der *AF4/FMR2*-Familie, darunter das AF4 Protein. Bemerkenswerterweise war die genaue Rolle dieses Proteins in den Komplexen bisher unbekannt oder wurde lediglich auf die strukturelle Integrität der Komplexe beschränkt. AF4 und speziell dessen N-Terminus ist über diese Rolle hinaus als Bestandteil des Fusionsproteins AF4-MLL eng mit der onkogenen Zelltransformation im Falle einer durch die t(4;11)(q21;q23) chromosomalen Translokation bedingter, akuter lymphoblastischer Leukämie assoziiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das AF4 Protein und im Speziellen sein N-Terminus in der Lage ist, die zelluläre Transkription durch die Aktivierung und Rekrutierung von P-TEFb zu aktivieren. In Anwesenheit von AF4 wird die Kinase-Untereinheit CDK9 des

P-TEFb post-translational an Lysinresten modifiziert und damit aktiviert sowie die C-terminale Domäne der RNAP II im Kontext stärker phosphoryliert. Gleichzeitig wurde das P-TEFb inaktivierende Protein HEXIM1 stärker exprimiert. AF4 und AF4-MLL waren weiterhin in der Lage ein Elongations-kontrolliertes Reporter-gen zu aktivieren. Gleichzeitig führte die Überexpression des AF4 zu einer Erhöhung der zellulären RNA Menge. Zur genaueren Untersuchung der AF4-abhängigen Mechanismen wurden zwei Zelllinien erstellt, die zum Einen eine induzierbare und reproduzierbare Überexpression und Reinigung des AF4 erlaubten (TCZP-AF4ST) und zum Anderen durch lentiviralen *knock-down* eine an AF4-Mangelsituation nachstellten (AF4kd V100). Es konnte so gezeigt werden, dass AF4 über P-TEFb hinaus eine regulative Funktion gegenüber Transkription-assoziierten Faktoren wie CDK7, MENIN und NFκB besitzt und dass diese Faktoren vorrangig, analog zu P-TEFb, mit dem N-Terminus des AF4 interagieren. Die Überexpression von AF4 führte über die Bindung an die 7SK snRNA und deren Degradation zur Rekrutierung des P-TEFb aus den Speicherkomplexen in distinkte AF4-assoziierte Komplexe und zu einer Umverteilung des Faktors auf distinkte Loci im Zellkern, wobei der AF4 N-Terminus für sich alleine jedoch nicht in der Lage war, diese Funktion auszuüben. Im Falle eines Mangels an AF4 kam es zur Wachstumsretardierung der Zellen sowie zu einem völligen Aktivitätsverlust in Reporter-genversuchen.

Die Tatsache, dass AF4 ein zentrales Element in der Elongationskontrolle darstellt führte zu der weitergehenden Vermutung, dass virale *immediate early* (IE) Proteine zur Kontrolle viraler Genexpression auf der Ebene der Elongation ebenfalls auf dieses Wirtsprotein zugreifen können. Es konnte vor diesem Hintergrund gezeigt werden, dass AF4 tatsächlich mit den IE-Proteinen IE1 (HCMV) und Zta (EBV) aus der Familie der Herpesviren interagiert und durch die Stabilisierung des AF4 Proteins eine kooperative, transaktivierende Funktion auf ein *ALOX5* Reporter-gen ausgeübt wurde. Es wurde gezeigt, dass die viralen IE-Proteine dabei Komponenten der AF4 Komplexe sind und in der Zelle zur epigenetischen Regulation des *ALOX5* Gens führen. Weiterhin konnte in diesen Experimenten dargestellt werden, dass AF4 über seine Rolle in der Elongationskontrolle hinaus auch distinkte Effekte in der Aktivierung von Promotoren und damit in der Initiation der Transkription zeigt. Damit konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die essentielle Rolle des AF4 Proteins in der Elongationskontrolle und der Initiation der Transkription als auch in der Infektion durch Herpesviren gezeigt werden.

2. Einleitung

2.1. Transkription

2.1.1. Allgemeines

Der genetische Informationsfluss wird im Allgemeinen als ein zweistufiger, konsekutiver Prozess beschrieben und führt zur Expression von codierenden Genen und damit zur Synthese von Proteinen. Transkription (von lateinisch *transcribere* "um/überschreiben") beschreibt den ersten der beiden fundamentalen Prozesse in der zellulären Genexpression, nämlich die Übersetzung eines spezifischen DNA-Abschnittes des Genoms in komplementäre RNA. Dieser Prozess leitet damit die Umwandlung der sequentiellen, codierten Informationen, welche in Form der Gene in der DNA hinterlegt sind, in dreidimensionale und funktionelle Produkte ein (siehe Abbildung 2.1. A). Damit wird aus der "geschriebenen", passiven Information der DNA ein physisches Konstrukt, welches aktiv eine oder mehrere Aufgaben wahrnimmt. Die Transkription wird als mehrphasiger, zyklischer Prozess verstanden, in dem die beteiligten Faktoren durch verschiedene Stadien prozessieren (siehe Abbildung 2.1. B). Die Gesamtheit aller zu einem Zeitpunkt transkribierter RNA in einer Zelle bezeichnet man als Transkriptom. Betrachtet man den genetischen Informationsfluss, so stellt die Transkription selbst nicht den direkten Übergang auf die funktionelle biologische Ebene in Form der Proteine und Makromoleküle dar, auch wenn diese Ansicht in Hinblick der Ergebnisse aus dem letzten Jahrzehnt nicht vollständig korrekt ist. Transkription produziert durch die RNA vielmehr eine Zwischenstufe, die für verschiedene Zwecke in der Zelle verwendet werden kann. Die Weitervermittlung von Informationen in Form von *messenger*-RNA (mRNA) als Edukt der Translationsreaktion ist neben der Synthese ribosomaler RNA dabei jedoch weiterhin dominant. Für die Zelle ergibt sich an dieser Stelle eine komplexe Regulationsebene in der entsprechend den Bedürfnissen und Umwelteinflüssen die benötigten RNA-Produkte zielgerichtet synthetisiert werden können. So findet man neben vielfältigen direkten Modifikationen der RNA wie dem 5'-Methylcapping, der Entfernung von endständigen polyA-Sequenzen oder dem Spleißen der prä-mRNA (*heterogeneous nuclear RNA*, hnRNA) grundlegend auch vielfältige verschiedene Formen der RNA selbst, deren Funktionen weit über die einfache Weitergabe von Informationen hinausgeht. Die Regulation der Transkription ist entsprechend diesen Anforderungen und Möglichkeiten vielschichtig und erfordert eine feinabgestimmte Maschinerie an Enzymen und Transkriptionsfaktoren. Deren genaue Wirkungsweise und Abhängigkeit ist immer noch weit davon entfernt verstanden zu sein und zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung.

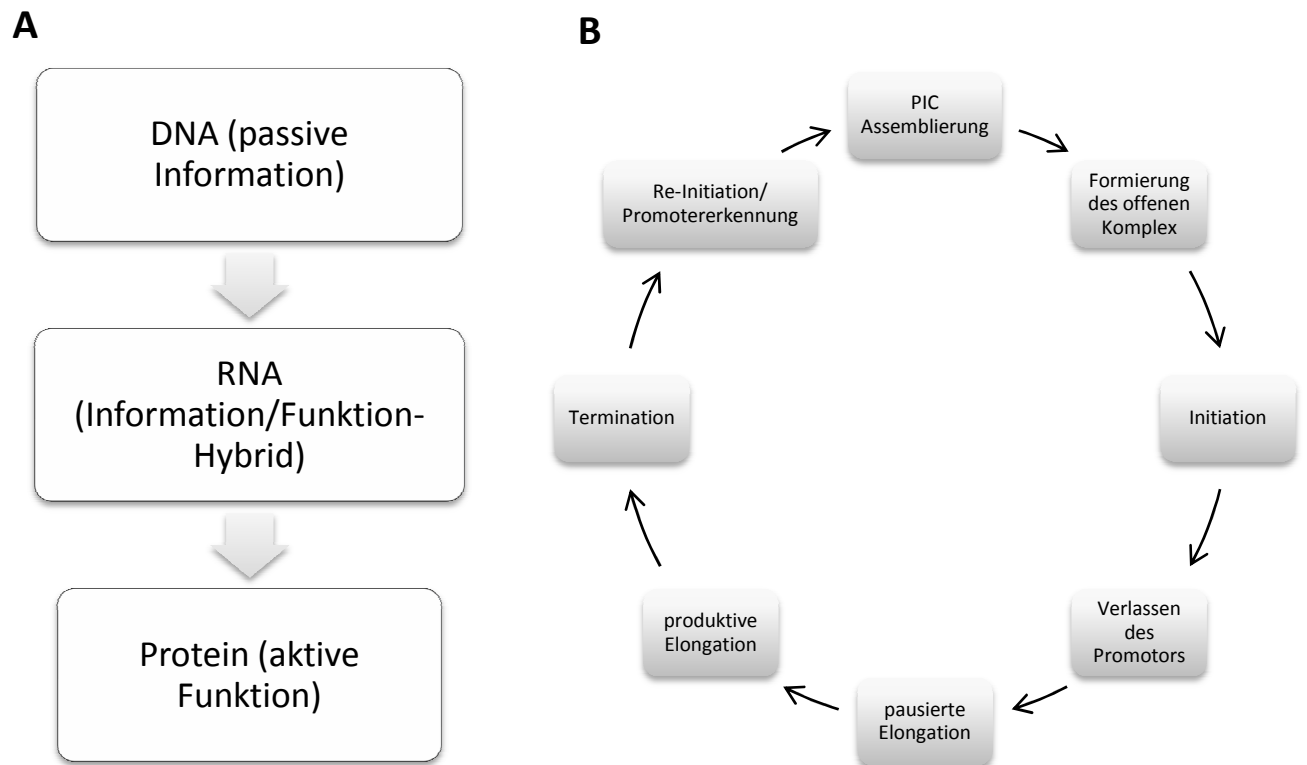


Abbildung 2.1. A) Der genetische Informationsfluss. B) Die zyklischen Phasen der Transkription in Eukaryoten.

2.1.2. Die Phasen der Transkription

Gemäß der Komplexität der Transkription erfolgt eine Einteilung des Prozesses in mehrere Phasen. Jede dieser Phasen benötigt eine Vielzahl an teilnehmenden Faktoren und wird in der Folge kurz erläutert, um eine Übersicht für die folgenden Kapitel zu schaffen. Grundsätzlich kann die Transkription analog zum Zellzyklus¹ als eine zyklische Abfolge von Schritten betrachtet werden, deren jeweilige Vollendung die Voraussetzung für den folgenden Schritt ist und die sich untereinander im Sinne einer Rückkopplung beeinflussen.

Grundsätzlich beginnt die Transkription mit der Bindung eines Aktivators an ein spezifisches Enhancer-DNA-Element, was zur schrittweisen Rekrutierung der generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) sowie der RNA-Polymerase II (RNAP II) zum zugehörigen, mehrteiligen Kernpromotor führt². Man spricht hier von der Erkennung des Kernpromotors (*core Promotor recognition*). Es wird diskutiert, ob alternativ zu dem ursprünglichen Modell der sequentiellen Assemblierung ein RNAP II-Holoenzym existiert, das einen bereits vollständig assemblierten Komplex zu den Promotoren rekrutiert^{3,4}. Diese These ist allerdings in Anbetracht der zyklischen Natur der Transkription zu hinterfragen, denn ein solcher Komplex ist nur an freien Promotoren sinnvoll. Eine *de novo* Initiation der Transkription ist jedoch selten und es wird angenommen, dass wesentliche Faktoren der Transkriptionsmaschinerie am Promotor

zurückbleiben, um für eine Re-Initiation bereit zu stehen^{5,6}. Die Bindung eines Holoenzym würde dann zur Redundanz mehrerer Faktoren führen.

Die Errichtung der korrekten Architektur dieses Prä-Initiationskomplexes (PIC, *Pre-initiation complex*) und die Modifikation seiner Untereinheiten wird als PIC-Assemblierung bezeichnet (*PIC assembly*). Dabei akkumulieren die GTFs nicht gleichmäßig innerhalb des PIC, sondern sind als ein Fließgleichgewicht assoziierender und dissoziierender Faktoren zu verstehen. Nur in Anwesenheit der korrekten Komposition aktiver GTFs ist die RNAP II stabil mit der DNA assoziiert und kann mit der Synthese der RNA beginnen^{7,8}. Nach der Bindung schließt sich die RNAP II durch flexible Bindedomänen um die Promotor-DNA und muss durch die enzymatische Aktivität eines GTF in einen geöffneten Zustand überführt werden. Dies wird zusammen mit der folgenden Öffnung der DNA-Helix durch zwei GTF-spezifische, ATP-abhängige DNA-Helikasen als Formierung des offenen Komplexes oder Aufschmelzen des Promotors bezeichnet (*open complex formation/Promotor melting*)^{9,10}. Die Gesamtheit der geöffneten DNA-Helix mit dem inkorporierten PIC bildet die sogenannte Transkriptionsblase (*transcription bubble*), welche sich dann während der Elongation über das Gen bewegt.

Zusätzlich muss für eine produktive Transkription ein epigenetisches Umfeld geschaffen werden, welches das Voranschreiten der RNAP II ermöglicht. Dazu werden histonmodifizierende und Chromatin-remodellierende Enzyme rekrutiert, welche an den Promotor-assoziierten Nukleosomen den Übergang von räumlich kondensiertem Heterochromatin zu transkriptionell aktivem, offenem Euchromatin vermitteln¹¹⁻¹³. Die Reihenfolge im Auftreten solcher Histonmodifikatoren und der GTFs ist nicht uniform, sondern scheint Gen- und Kontextspezifität zu zeigen. So kann es für die Bindung der GTFs notwendig sein, dass bereits ein entsprechendes epigenetisches Umfeld vorhanden ist^{14,15}. Im Gegenzug kann auch das Eintreffen der Histonmodifikatoren die Transkription an bereits assemblierten PICs auslösen^{16,17}.

Nachdem alle Faktoren bereit stehen, kann die RNAP II die Transkription initiieren und den Promotor verlassen (*Promotor clearance*). Dabei müssen jedoch zwei Kontrollpunkte passiert werden. Zum Einen kann die RNAP II die Initiation im Falle unstabiler, sehr kurzer (< 6 Nukleotide) Transkripte abbrechen (*abortive transcription*), es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein Korrekturlesen der gebildeten RNA¹⁸. Erst nach dem Erreichen einer Länge von ca. 25 Nukleotiden wird die RNA mit einer stabilisierenden 5'-Methylcap versehen und zeigt damit den Übergang zur produktiven Initiation an¹⁹. Zum Anderen muss das Muster spezifischer Modifikationen an der C-terminalen Domäne der RNAP II korrekt eingestellt werden, sie wechselt in dieser Transition von einem hypo- zu einem hyperphosphorylierten Zustand^{20,21}. Es kommt dabei zur Dissoziation und dem Recyceln bzw. Zurückbleiben von Initiationsfaktoren (s.o.)^{22,23} bei gleichzeitiger Assoziation von Faktoren der RNA-Reifung²⁴

und Elongations-assoziiierter Faktoren²⁵. Die RNAP II erfährt in einer Vielzahl von Genen, vorrangig solcher, die durch Signalinduktion reguliert und Entwicklungsprozessen zugeordnet sind, eine zusätzliche Kontrolle. Sie pausiert nach der Synthese eines kurzen, etwa 50 Nukleotide langen, Transkripts (*stalled/paused/poised polymerase*, synonym) indem sie durch negative Elongationsfaktoren blockiert wird^{26,27}. Diese rekrutieren Capping-Enzyme, welche die oben beschriebene Stabilisierung der RNA vermitteln²⁸ und so sicher stellen, dass nur stabile und korrekte Transkripte synthetisiert werden. Schlussendlich liegen zwei antagonistische Histonmodifikationen an der pausierten RNAP II vor, die im Falle einer Rekrutierung aktivierender Histonmodifikatoren²⁵ schnell im Sinne einer produktiven Elongation aufgelöst werden können²⁹. Erst nach der Erfüllung aller genannten Kontrollkriterien kann die RNAP II voranschreiten und in die Phase der Elongation wechseln.

Im Laufe der Elongation verändert sich der Phosphorylierungszustand der RNAP II erneut³⁰ und sie assoziiert mit Faktoren, die ihre Prozessivität begünstigen und regulieren. So werden durch Histonmodifikationen strangabwärts der RNAP II aktivierende epigenetische Signaturen erzeugt^{31,32}, blockierende Histone durch Chaperone beseitigt und strangaufwärts der RNAP II wieder in die DNA integriert^{33,34}. Die Histone werden durch Hypoacetylierung reversibel inaktiviert, um eine ungewollte Re-Initiation an dieser Stelle zu vermeiden³⁵. Zusätzlich assoziieren Spleißfaktoren mit der elongierenden RNAP II und führen so zusammen mit obengenannten Faktoren zu einer co-transkriptionellen Reifung der RNA^{24,36,37}.

Schlussendlich kommt es am 3'-Ende des transkribierten Gens zur Termination der Transkription. In Eukaryoten wurden zwei Wege der Termination identifiziert, von denen hier jedoch nur der Polyadenylierungs-abhängige Weg vorgestellt werden soll. Die meisten Protein-kodierenden Gene tragen an ihrem 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal mit der Sequenz 5'-AAUAAA-3', die vor einer G/U-reichen Sequenz liegt. Nach der Transkription dieses Signals sinkt die Prozessivität der RNAP II schnell ab und sie pausiert strangabwärts des Signals (~200-800 Nukleotide). Die gebildete RNA wird darauf hin endoribonukleolytisch gespalten wobei der strangaufwärts liegende Abschnitt, also die codierende Region, polyadenyliert und der strangabwärts liegende Abschnitt degradiert wird. Dies wird im Menschen durch eine Reihe von Terminationsfaktoren vermittelt³⁸, welche von dem korrekten Phosphorylierungsmuster der RNAP II abhängig sind. Sie binden an die RNAP II sowie die RNA, induzieren das Pausieren der Polymerase und können erst dann die Termination und das Prozessieren der RNA sowie deren Export in das Zytoplasma einleiten^{39,40}. Interessanterweise führen Defekte in den Terminationssignalen zu reduzierten Transkriptionsniveaus bei den nachfolgenden, strangabwärts liegenden Genen⁴¹, was auf eine Interferenz des nicht pausierten RNAP II mit dem nächsten Promotor hinweist.

Aufgrund der zyklischen Natur der Transkription wird die RNAP II nach der Termination nicht degradiert oder von der Transkriptionsmaschinerie dissoziiert. Vielmehr erfolgt eine Wiederherstellung des Prä-Initiationsstatus durch die Umkehr der Hyperphosphorylierung in eine hypophosphorylierte Form der RNAP II. Dazu werden spezifische Phosphatasen zur RNAP II rekrutiert^{42,43}. Eine auf diese Weise recycelte RNAP II kann mit den am Promotor zurückgebliebenen GTFs interagieren und so die Transkription erneut einleiten. Die GTFs formen dabei ein essentielles Gerüst, an welches die RNAP II binden kann (*reinitiation scaffold*)^{6,44}. Man spricht hier von DNA-Schleifen (*gene looping*), welche die Promotoren und die terminalen Regionen eines Gens in unmittelbare Nähe bringen und der RNAP II so einen schnellen Übergang zur Re-Initiation ermöglicht^{45,46}.

Dieser zyklische Ablauf der Transkription darf nicht als ein singuläres und unabhängiges Ereignis an einem einzelnen Gen betrachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch weit entfernte, aktive Allele transkribierter Gene in subnukleären Kompartimenten colokalisieren können und dort in sogenannten "Transkriptionsfabriken" (*transcription factories*) parallel umgeschrieben werden. Diese bestehen aus einer Ansammlung aktiver RNAP II und einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, die migrierende Gene in Abhängigkeit ihrer Promotorstruktur und dem Vorhandensein von Introns spezifisch transkribieren^{47,48}. Solche bereitstehenden "Fabriken" könnten auch die Erklärung für die Identifizierung von RNAP II Holoenzymen sein, die dort als bereits assemblierte Komplexe vorliegen.

2.1.3. Genetische Elemente der Transkription

Zum Verständnis der Transkription ist es notwendig, die zentralen DNA-Elemente der Transkriptionsinitiation und -elongation in Struktur und Funktion zu erläutern. Im Folgenden werden diese Elemente mit ihren zentralen Eigenschaften vorgestellt. Der Fokus liegt hier auf der Transkription in höheren Eukaryoten.

2.1.3.1. Minimalpromotor/Kernpromotor

Der Minimalpromotor ist eine variable, mehrteilige DNA-Sequenz, die in unmittelbarer Nähe zur Transkriptionsstartseite (TSS, definiert als bp +1) liegt. Er ist unabdingbar für die Initiation der Transkription, da er u.a. die Bindungsstelle für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren bildet, die wiederum die RNA-Polymerasen rekrutieren. Das zuerst charakterisierte Element des Minimalpromotors war die hochkonservierte TATA-Box⁴⁹. Sie ist zwischen bp -35 bis -25 lokalisiert und besitzt im Menschen die Konsensussequenz 5'-TATAWA-3' (generell 5'-TATA(A/T)A(A/T)(A/G)-3'). Der Anteil an Minimalpromotoren mit einer TATA-Box liegt im Menschen bei rund 35%, wobei in der Erkennung bis zu zwei Basenfehlpaarungen möglich sind^{50,51}. Die TATA-Box selbst ist damit nicht zwingend für die Transkription erforderlich,

vielmehr unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Wegen der Prä-Initiation, einem TFIID-abhängigen und einem TFIID-unabhängigen/SAGA-abhängigen Weg^{52,53}. Das Vorhandensein einer TATA-Box sorgt für eine eindeutige Lokalisation der Transkriptionsinitiation. TFIID (Transkriptionsfaktor IID) ist der wichtigste Bindungsfaktor für diesen Minimalpromotor und ein Komplex aus dem zentralen TATA-*binding protein* TBP und 13 weiteren Faktoren, den TBP-*associated factors* TAFs⁵⁴. Während TBP die TATA-Box direkt bindet, interagieren die TAFs auf Elemente strangauf und -abwärts der TSS. Weitere Elemente sind direkt von der TATA-Box abhängig, so können die TFIIB Erkennungselemente (BREu und BREd, TFIIB *recognition element*) als auch das TAF1 Erkennungselement (DCE, *downstream core promoter*) nur in Kooperation mit einer TATA-Box funktionieren^{55,56} (siehe Abbildung 2.1.3.1.).

Das zweite wichtige Element im Minimalpromotor ist das ebenfalls konservierte Initiatorelement (INR) mit der Konsensussequenz 5'-YYANWYY-3' an der TSS, welches als Bindestelle für RNA-Polymerase II (RNAP II) im Komplex mit TFIIB, TFIIA und TFIID (TAF1, TAF2) dient^{57,58}. INR kann sowohl mit als auch ohne TATA-Box wirken. Die oben gezeigte Sequenz für INR gilt als die "strikte" Variante (sINR), die vor allem in TATA-losen Promotoren auftritt und dort mit einer Bindestelle des Transkriptionsfaktors SP1 wechselwirkt⁵⁹. Obwohl die TATA-losen (und auch INR-losen) Promotoren den größeren Anteil im Genom stellen, sind die Mechanismen der Initiation hier unklar. Neben raren Elementen wie XCPE1 oder MED-1 konnte unter Zuhilfenahme der Bioinformatik festgestellt werden, dass die meisten dieser Promotoren mit CpG-Inseln assoziiert sind^{60,61}. Aufgrund der Methylierungssensitivität der CpG-Elemente (Cytosine in dieser Position tendieren dazu, methyliert zu werden) könnte dies ein Hinweis auf epigenetische Regulationsmechanismen sein, die aber noch aufzuklären sind. Ein zusätzliches Phänomen ist das Vorhandensein von multiplen Initiationsstellen⁶². Man geht davon aus, dass in diesem Fall die Transkriptionsmaschinerie durch proximale Transkriptionsfaktorbindestellen rekrutiert wird und die Polymerase an mehreren geeigneten und naheliegenden Nukleotiden ansetzen kann. Solche Bindestellen proximal zur TSS sind häufig und es gibt dort eine Reihe stark repräsentierter Transkriptionsfaktoren wie SP1, NRF1 oder CREB⁵¹ (siehe Abbildung 2.1.3.1.).

Aufgrund der immer stärker in Erscheinung tretenden Diversifizierung des Minimalpromotors konnten mittlerweile auch verschiedene Varianten bestimmten Gruppen von Genen zugeordnet werden. So sind TATA-Box Promotoren mit gewebespezifischen Genen sowie Genen assoziiert, die u.a. für Prozesse in der Entwicklung, Wundheilung oder Entzündungsreaktionen zuständig sind^{63,64}. Auf der anderen Seite wurden TATA-lose sINR Promotoren vorrangig in Genen gefunden, die den Nukleotid-Metabolismus und die

Chromosomenorganisation beeinflussen⁵⁹. Neben seiner zentralen Rolle in der Initiation hat der Minimalpromotor auch Effekte auf die Transkriptionselongation bzw. das Voranschreiten der RNA-Polymerase II. So ist für die NFκB-vermittelte Transkription, welche Effekte auf die Elongation zeigt, die Positionierung eines Enhancer-Elements zu dem Minimalpromotor wichtig. Die Zielgene von NFκB können in ihrer Abhängigkeit von der TATA-Box in zwei Gruppen unterteilt werden. Minimalpromotoren mit TATA-Box werden durch P-TEFb reguliert (TFIID-unabhängig) und solche ohne TATA-Box durch DSIF (TFIID-abhängig)⁵³. Ähnliche Effekte konnten mittlerweile auch für die c-myc abhängige Transkription gezeigt werden⁶⁵. Da die RNA-Polymerase II sowohl in der Initiation als auch der Elongation die entscheidende Rolle spielt, ist diese übergreifende Relevanz des Minimalpromotors nachvollziehbar. Seine Struktur bestimmt die Zusammensetzung des Prä-Initiationskomplex und damit das funktionelle Umfeld der Polymerase.

Es besteht weiterhin ein Zusammenhang zwischen der Struktur des Minimalpromotors und der Genstruktur. Gene unter der Kontrolle von TATA-Box-losen Promotoren sind im Mittel dreimal so lang wie solche mit einer TATA-Box. Weiterhin ist die Länge eines Gens invers mit der Expressionsstärke der TATA-Box korreliert⁶³. Infolge dessen ist die TATA-Box für eine starke und explosive Transkription ("*bursty transcription*") kurzer Gene besser geeignet⁶⁶, während TATA-Box-lose Promotoren eine gleichmäßige Expression unabhängig von der Länge des Gens gewährleisten. Die konsekutiv laufenden RNA-Polymerasen könnten auf langen, also intronreichen, Genen bei explosiver Transkription kollidieren und damit die Elongation frühzeitig terminieren⁶⁷.

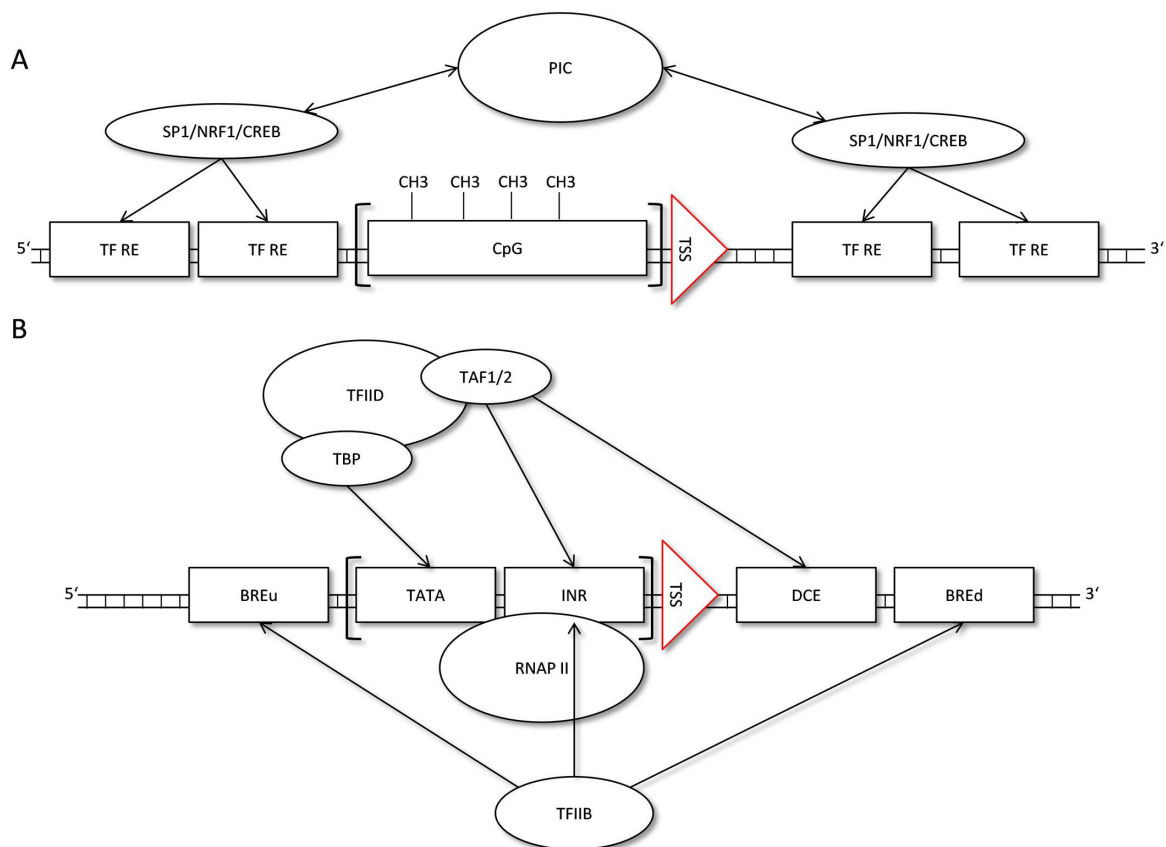


Abbildung 2.1.3.1 Vereinfachte Promotorstruktur in der eukaryoten Genexpression. (A) TATA/INR-lose Promotoren wirken vermutlich über methylierungssensitive, epigenetisch regulierte Promotorbereiche an CpG-Inseln. Proximal dazu sind Bindestellen (TF RE, *transcription factor recognition element*) für diverse Transkriptionsfaktoren (z.B. SP1, NRF1, CREB) lokalisiert, welche den PIC rekrutieren. (B) Promotoren mit einer TATA-Box und INR Element wirken über die sequentielle Bindung von GTFs an diese und weitere proximal lokalisierte Elemente (BREu, BREd, DCE) in der unmittelbaren Umgebung der TSS. So kann am INR Element die Bindung der RNAP II in Komplex mit GTFs wie TFIID und TFIIB stattfinden.

2.1.3.2. Enhancer/Silencer

Enhancer (von englisch *to enhance* "erhöhen, verbessern") sind der klassischen Definition nach regulative Sequenzen der DNA, welche die Transkription aktivieren und nicht Teil des Kernpromotors sind. Sie entkoppeln damit die Steuerung der Transkription von diesem und fügen eine zusätzliche Regulationsebene hinzu. Nach der Entdeckung in Viren wurden sie schnell auch in der Expression gewebsspezifischer Gene im Menschen identifiziert^{68,69}. Sie gelten als distale Elemente und sind i.d.R., aber nicht ausnahmslos, *in cis*-wirkend⁷⁰ (siehe Abbildung 2.1.3.2. A). Ihre Lokalisation ist nicht stringent, sie können sowohl strangaufwärts als auch -abwärts und weit (100.000+ bp in Metazoen⁷¹) entfernt von der TSS und dem Kernpromotor liegen, in Introns und auch in inverser Orientierung^{68,72}. Im Laufe der Zeit wurden neben aktivierenden Elementen auch Sequenzen gefunden, welche die Transkription reprimieren. Der Nomenklatur folgend wurden diese Sequenzen Silencer (von englisch *to*

silence "abdämpfen, zum Schweigen bringen") getauft. Die Trennschärfe zwischen Enhancer und Silencer ist jedoch gering, da auch repressiv wirkende Sequenzen in Enhancer-Elementen liegen können⁷³.

Die grundlegende Funktionsweise dieser Elemente ist identisch, der funktionelle Einfluss wird erst durch die assoziierten Faktoren bestimmt. Beide dienen als Bindestellen für typischerweise zwei oder mehr sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren wie NFκB oder AP1^{74,75}, welche entweder direkt auf die RNA-Polymerase bzw. den Prä-Initiationskomplex oder indirekt auf andere Transkriptionsfaktoren sowie das Chromatin einen Einfluss ausüben^{76,77}. Daher kann keine allgemeine Konsensussequenz abgeleitet werden, sondern nur jeweils eine Transkriptionsfaktor-abhängige Konsensussequenz. Üblicherweise vereint ein Enhancer einen Cluster aus Bindestellen⁷⁸. Die Transkriptionsfaktoren werden je nach Funktion als Aktivatoren oder Repressoren bezeichnet; sie sind *trans*-wirkende Faktoren. Enhancer und Silencer werden oft mit Promotoren der Gene assoziiert, die einen Einfluss auf die Entwicklung und die gewebsspezifische Transkription haben^{79,80}. Durch die Balance aus Aktivatoren und Repressoren können so in spezifischen Entwicklungsstadien und Gewebefunktionen Gene gezielt gesteuert werden. Dies hat auch bemerkenswerte evolutionsbiologische Aspekte⁸¹. Damit Enhancer den Minimalpromotor beeinflussen können, müssen die vor allem in Metazoen beträchtlichen Entfernungen zu ihm überbrückt werden. Man geht davon aus, dass manche Transkriptionsfaktoren in der Lage sind, eine Schleifenbildung der chromosomalen DNA zu induzieren ("*DNA/chromatin looping*", siehe auch 2.1.3.3.). Sie bilden so eine räumliche Nähe zwischen Enhancer und Promotor aus und überbrücken isolierende Abschnitte auf dem Chromosom, welche in der Schleife liegen⁸². Die ablaufenden Prozesse sind nicht im Detail aufgeklärt, man geht jedoch davon aus, dass Cohesin eine tragende Rolle spielen^{83,84}.

Inwiefern Transkriptionsfaktoren in einem Enhancerelement direkt miteinander interagieren oder voneinander abhängig arbeiten wird noch immer diskutiert. Eine vollständige Kooperation der Faktoren durch Bildung von gemeinsamen Proteinkomplexen via Protein-Protein-Interaktionen wird im Modell der "Enhanceosomen" beschrieben (siehe Abbildung 2.1.3.2. B). Die Faktoren erzeugen so in ihrer Summe ein einzelnes funktionelles Signal, beschrieben am Beispiel des Interferon-β Gens⁸⁵. Alternativ könnten verschiedene Transkriptionsfaktoren einzelne Signale setzen, deren Summe abhängig vom Kontext und Beobachter einen Einfluss auf die Transkription ausübt. Man spricht hier von dem "Billboard"-Modell (in etwa "Anschlagtafel/Reklametafel", siehe Abbildung 2.1.3.2. C)⁸⁰. Im Allgemeinen und speziell für das Enhanceosomen-Modell ist die Anordnung der Bindestellen innerhalb des Elements entscheidend für dessen Funktionalität, man spricht von der "Grammatik" und dem "Syntax" des Enhancers⁸⁵. Zusätzlich ist die Orientierung der Bindung wichtig, da eine

Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Basenpaare zum Verlust der Funktionalität führt. Eine bedeutende Ausnahme ist die Insertion von genau 10 bp, also genau einen Umlauf der DNA-Helix, die keinen Funktionsverlust herbeiführt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer gerichteten Interaktion benachbarter Transkriptionsfaktoren^{11,86}.

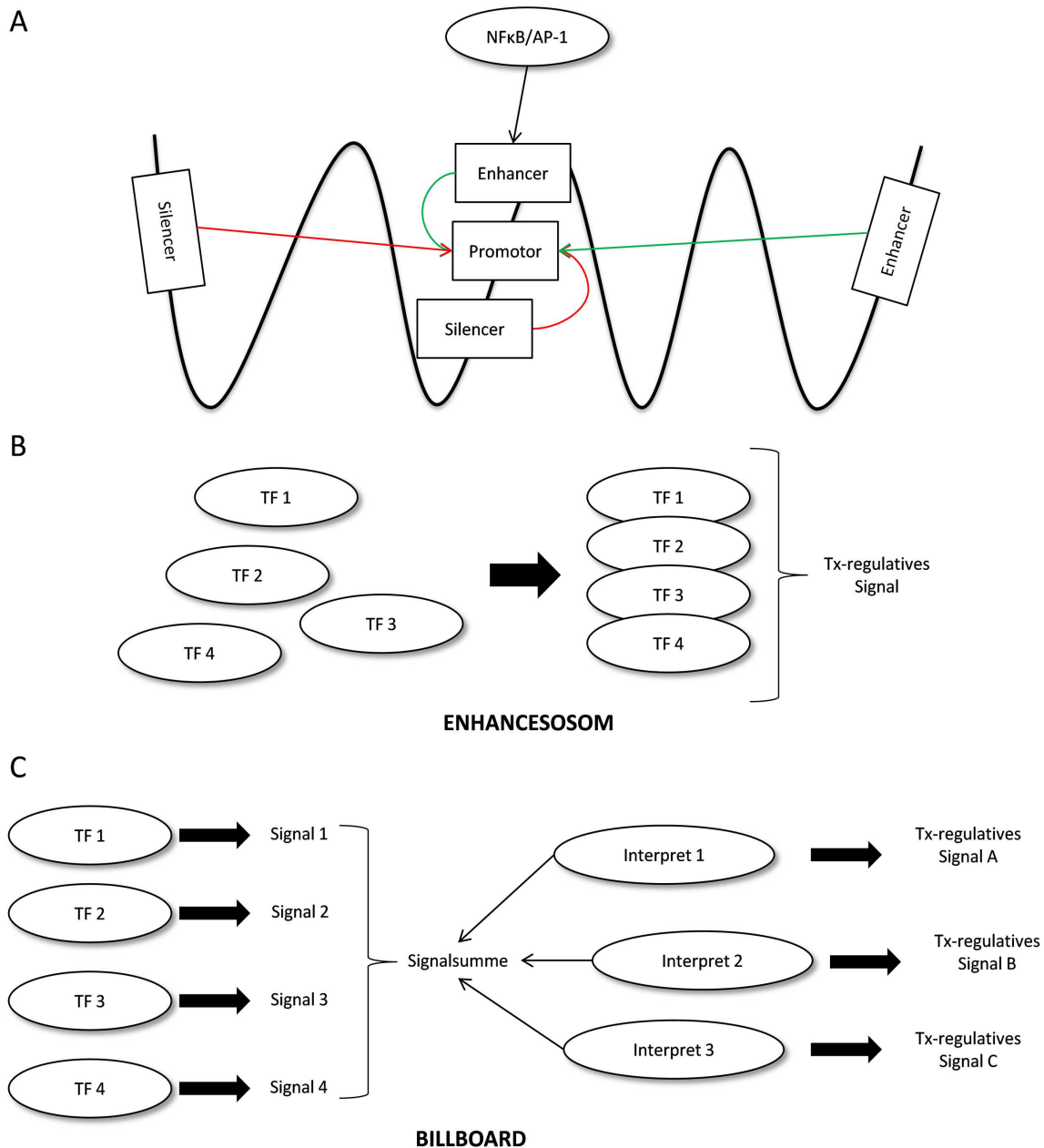


Abbildung 2.1.3.2. Enhancer/Silencer. (A) Schematische Darstellung der Lokalisation Promotor-regulierender *in cis* wirkender Elemente (Enhancer/Silencer) im gleichen DNA-Strang. Die aktivierenden/repressiven Einflüsse dieser Elemente erstellen eine Kontext-abhängige Aktivität des Promotors und damit der Genexpression. (B) Das statische Modell der "Enhancesosomen" basiert auf der Annahme, dass die Interaktion proximal bindender Transkriptionsfaktoren durch Bildung von Proteinkomplexen ein einheitliches Signal bzgl. der Transkription erzeugt. (C) Das dynamische "Billboard"-Modell weist jeden Transkriptionsfaktor ein distinktes Signal zu. Die so entstehende Signalsumme wird Kontext-abhängig durch den jeweiligen Interpreten in ein Transkriptions-regulierendes Ereignis umgesetzt.

2.1.3.3. Isolatoren/CTCF

Isolatoren (*insulators*) sind DNA-Protein-Komplexe, die eine Blockade der Interaktion zwischen Enhancer und Kernpromotor oder eine Abschirmung der repressiven Effekte des Heterochromatin vermitteln^{87,88}. Sie organisieren und erhalten so funktionelle Regionen in der Transkription. Ähnlich wie ein Enhancer besteht ein Isolator aus einer DNA-Sequenz und einem sequenzspezifisch bindenden Protein, welches wiederum mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten kann. In den Vertebraten wird diese Funktion hauptsächlich durch den Isolator CTCF (*11-zinc finger protein, CCCTC binding factor*) ausgeübt⁸⁹. CTCF ist ein hochkonserviertes Protein mit einer annähernd hundertprozentigen Homologie zwischen Maus, Huhn und Mensch und gilt als evolutionäres Destillat der Vielzahl an Isolatoren, die man in *Drosophila melanogaster* identifiziert hat^{90,91}. Ein homozygoter *CTCF* knockout führt entsprechend zu einer frühen embryonalen Letalität in Mäusen⁹². CTCF kann an eine Vielzahl sehr divergenter DNA-Sequenzen und Proteine unter Verwendung seiner Zinkfinger binden, unter anderem auch an Cohesin (siehe auch 2.1.3.2.). Cohesin wurde im Genom in Abhängigkeit von CTCF an dessen Zielsequenzen identifiziert. Es bildet einen ringförmigen Komplex, der u.a. in der Lage ist Chromatiden während der S- und M-Phase des Zellzyklus zusammenzuhalten⁹³⁻⁹⁵. Die Fähigkeit des Cohesin inter- und intrachromosomal Kontakte herzustellen kann von CTCF genutzt werden, um bestimmte genomische Regionen zu reorganisieren und somit transkriptionell zu regulieren. Es kommt über den Kontakt zwischen CTCF mit mehreren seiner Bindestellen und/oder assoziierter Faktoren wie Cohesin zur Ausbildung von definierten, dreidimensionalen Schlaufen im Chromatin (*chromatin loops*), welche die Zugänglichkeit der enthaltenen Gene und Gengruppen für funktionelle Faktoren ermöglicht oder blockiert. Andere Bindungspartner des CTCF wie CHD8 (*chromodomain helicase 8*) vermitteln einen Einfluss auf die Chromatinstruktur durch CpG DNA-Methylierung und Histonacetylierung und weisen so auf zusätzliche epigenetische Effekte durch CTCF hin⁹⁶. Darüber hinaus wurde ein direkter Einfluss auf die RNA-Polymerase II nachgewiesen. So assoziiert RPB1 mit intakten CTCF-Bindungsstellen, welche dann in promotorlosen *C-MYC* Reporter genen hinreichend für deren Transkription war⁹⁷.

Die genomische Verteilung des CTCF ist noch nicht hinreichend geklärt, Studien gehen von bis zu vierzigtausend Bindungsstellen im Genom der Vertebraten aus⁹⁸. Obwohl die Anzahl der Bindungsstellen mit der Gendichte eines Chromosoms korreliert, liegt etwa die Hälfte dieser Stellen außerhalb von Genen und im Mittel 48 Kilobasen entfernt von Promotoren. Nur ca. 20% liegen in der Nähe von Promotoren und rund ein Drittel ist in Genen lokalisiert. Diese Verteilung konnte sowohl in humanen Fibroblasten (IMR90) als auch in ruhenden CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden^{99,100}. Betrachtet man die Lokalisierung aus einer größeren Perspektive lassen sich weitere Verteilungsmuster ableiten; so enthalten Regionen mit einer

unterdurchschnittlichen Anzahl an CTCF-Bindestellen gemeinsam regulierte Gengruppen, also Gruppen die nicht voneinander isoliert werden müssen. Weiterhin findet man CTCF-Bindestellen in den Übergängen von epigenetisch unterschiedlich regulierten Regionen des Chromatin, wie z.B. flankierend von H3K27me (Histon 3, Lysin 27 Monomethylierung) Domänen in CD4⁺ T-Zellen¹⁰⁰. Im Kontext dazu ist die Lokalisation von ca. 30-50% der CTCF-Bindestellen zelltypspezifisch, was auf die Regulation definierter Gengruppen im jeweiligen Entwicklungsprozess (*cell fate*) hinweist. Diese Funktion der Isolatoren erfordert eine feinabgestimmte Regulation um die benötigten Genexpressionsmuster und nukleäre Organisation während der Differenzierung der Zelle korrekt zu steuern. Ein Ansatz hierbei ist die Kontrolle der Protein-DNA-Interaktion durch CpG-Methylierung und genomische Prägung. So bindet CTCF im *H19/IGF2* Locus nur an nicht methylierte Bindungsstellen im Mutterallel¹⁰¹, ein ähnliches Verhalten konnte auch für andere Genloci wie *RASGRF1*, *GRB10* oder *INK/ARF* gezeigt werden¹⁰²⁻¹⁰⁴. Eine weitere Möglichkeit der Regulation ist die posttranslationale Modifikation von CTCF mittels Phosphorylierung seines C-Terminus durch die Proteinkinase CK2 (*casein kinase II*)¹⁰⁵ oder ADP-Ribosylierung durch PARP-1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*)¹⁰⁶. Beide Effekte führen zur funktionellen Inaktivierung von CTCF, verhindern jedoch nicht dessen Bindung an Zielsequenzen. Darüber hinaus gibt es konkurrierende, paraloge Faktoren wie CTCFL/BORIS (*brother of regulator of imprinted sites*), welche durch ein zentrales 12-Zinkfinger-Motiv an analoge DNA-Sequenzen binden. Im physiologischen Kontext werden diese Faktoren in der Keimbahnentwicklung eingesetzt¹⁰⁷. Im Falle von deregulierter Expression können diese Konkurrenten jedoch CTCF verdrängen und so zu veränderten, pathogenen Genexpressionsmustern führen¹⁰⁸.

2.1.4. RNA-Polymerasen

RNA-Polymerasen (genauer: DNA-abhängige RNA-Polymerasen, *DNA-dependent RNA polymerases*, RNAP) sind das zentrale Element der Transkription und wurden 1960 zum ersten Mal beschrieben¹⁰⁹. Sie bilden eine Gruppe von kernständigen Enzymen, welche die Synthese eines RNA-Strangs entlang seiner DNA-Matrize katalysiert. Chemisch betrachtet sind Polymerasen Nukleotidyltransferasen, die Ribonukleotide am 3'-Ende eines RNA-Strangs *de novo* synthetisieren. In Eukaryoten sind insgesamt fünf Formen der RNAP identifiziert worden (RNAP I-V), wobei RNAP IV und V nur in Pflanzen gefunden und an dieser Stelle nicht näher behandelt werden^{110,111}. Die RNAP sind einschließlich ihrer prokaryotischen Formen sowohl strukturell als auch mechanistisch eng miteinander verwandt¹¹², haben aber distinkte katalytische Kerneinheiten und Einsatzgebiete in der Transkription. Sie formieren sich aus zwei großen Untereinheiten (verwandt mit β und β' der *E.coli* RNA-Polymerase) und 10 bis 15 z.T. paralogen, kleineren Untereinheiten¹¹³. RNAP I-III unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Lokalisation, so findet man RNAP I in den

Nukleoli während RNAP II und III im Nukleoplasma vorhanden sind¹¹⁴, sowie ihrer Sensitivität gegenüber α -Amanitin¹¹⁵. In dieser Arbeit ist lediglich die RNAP II von zentraler Bedeutung und wird daher detailliert vorgestellt. Die RNAP I und III werden an dieser Stelle nicht näher erläutert, es sei auf die entsprechende Literatur verwiesen¹¹⁶⁻¹¹⁹.

2.1.4.1. RNA-Polymerase II

Die **RNAP II** ist die zur Zeit strukturell und funktionell am besten charakterisierte RNA-Polymerase des Menschen. Die klassische Rolle der RNAP II ist die Synthese der prä-mRNA sowie eines Großteils der snRNA (*small nuclear RNA*) und microRNA¹²⁰. Sie produziert damit das entscheidende Substrat der ribosomalen Proteinbiosynthese und ist der zentrale Faktor in der Umsetzung des genetischen Codes in funktionelle Proteine. Die durch die RNAP II abgelesenen Gene werden als Klasse-II-Gene bezeichnet. RNAP II ist ein 550 kDa Multiproteinkomplex mit 12 Untereinheiten. Die beiden großen Untereinheiten Rpb1 (*POLR2A*) und Rpb2 (*POLR2B*) bilden die gegenüberliegenden Flanken der Kavität des aktiven Zentrums. Die kleineren Untereinheiten binden entweder direkt an Rpb1 und Rpb2 oder bilden eine Brücke zwischen den beiden großen Untereinheiten. Entsprechend besteht die RNAP II aus drei miteinander interagierenden Gruppen, Rpb1 (bestehend aus Rpb1, Rpb5, Rpb6 und Rpb8), Rpb2 (Rpb2 und Rpb9) sowie Rpb3 (Rpb3, Rpb10, Rpb11, Rpb12)^{10,121}. Zusätzlich zu diesen Kerneinheiten ragt ein Rpb4-Rpb7 Heterodimer aus dem Kern heraus, der sich von der Oberfläche des Rpb1 nach außen erstreckt. Auf der Gegenseite bindet TFIIIF an die Oberfläche des Rpb2^{122,123}. Ausgehend von den Erkenntnissen aus dem Aufbau der bakteriellen RNA-Polymerase, welche homologe Untereinheiten besitzt (Rpb1/ β' , Rpb2/ β , Rpb3/ α , Rpb11/ α und Rpb6/ ω), ist die Biogenese der RNAP II in drei Schritte unterteilt^{124,125}. Zuerst kommt es zur Assemblierung des Rpb3 Subkomplexes, an den sequentiell erst Rpb2 und abschließend Rpb1 bindet^{126,127}.

Der Aufbau von makromolekularen Komplexen wie der RNAP II erfolgt *in vivo* nicht alleine durch die Anwesenheit der Untereinheiten, sondern benötigt das Zusammenspiel mit zusätzlichen Faktoren, die jedoch nicht zum finalen Komplex gehören. Dazu gehören der R2TP-Komplex (im Besonderen hSpagh), die GPN-loop GTPasen GPN1, GPN2, GPN3 sowie RPAP1, RPAP2 (*RNA-polymerase associated proteins*) und GrinL1a (*glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A*)¹²⁸⁻¹³⁰. Um ihre Funktion wahrzunehmen, muss die RNAP II in den Kern importiert werden. Dies erfordert eine bereits vollständig assemblierte RNAP II, da ein Defizit einer beliebigen Untereinheit oder von oben genannten Faktoren zur zytoplasmatischen Akkumulation des Rpb1 führt^{130,131}. Da keine der Untereinheiten der RNAP II oder der Assemblierungsfaktoren eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) trägt, muss es einen zusätzlichen Faktor geben, der den

Kernimport vermittelt. Diese Rolle wird von Iwr1/SLC7A6OS (*solute carrier family 7, member 6 opposite strand*) übernommen. Iwr1 interagiert mit RNAP II an der Kavität des aktiven Zentrums und trägt eine zweiteilige NLS, welche die Interaktion mit α -Importin herstellt. Da sich die Kavität erst im letzten Assemblierungsschritt ausbildet, kann Iwr1 durch seine Bindung gleichzeitig die Vollständigkeit der RNAP II überprüfen¹³². Neben dem Import der vollständigen RNAP II ist das Recyclen und damit der Export assoziierter Faktoren wie Iwr1, HSP90 oder GPN1 von Bedeutung. Eine Deletion der NES (nukleäre Exportsequenz) des Iwr1 oder Inhibition des Exportins Crm1/Exportin1 (*Chromosome region maintenance 1 protein homolog*) inhibiert den Import der RNAP II^{128,133}.

Trotz der Komplexität des Multiproteinkomplexes der RNAP II ist diese nach dem Kernimport nicht in der Lage, die Transkription autonom einzuleiten. Sie benötigt dazu vielmehr eine Basisausstattung an Transkriptionsfaktoren, die basalen oder generellen Transkriptionsfaktoren GTF (*general transcription factors*)¹³⁴. Sie bilden vorrangig den Prä-initiationskomplex (PIC), der mit der RNAP II interagiert und sie mit dem Promotor assoziiert. Die Kombination aus PIC und RNAP II wird auch als basaler Transkriptionskomplex BTC (*basal transcription complex*) bezeichnet¹³⁵. Zusätzlich zu diesen *trans*-wirkenden Faktoren unterliegt die RNAP II stark komplexen Modifikationen während des Transkriptionszyklus, welche *in cis* und abhängig von der Phase der Transkription regulativ einwirken.

Das humane Rpb1 besitzt an seinem C-Terminus eine Domäne, die 52 Tandem-Wiederholungen eines Heptapeptids mit der Konsensussequenz Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 (N-YSPTSPS-C) enthält¹³⁶. Diese Domäne wird als CTD (*C-terminal domain*) bezeichnet und ist Substrat zahlreicher kovalenter Modifikationen, darunter hauptsächlich Phosphorylierungen, aber auch Glykosylierung, Ubiquitylation und Methylierung^{137,138}. In RNAP I und III ist diese Domäne nicht vorhanden. Die Modifikationen der CTD haben einen unmittelbaren Einfluss auf das Voranschreiten der RNAP II in den Phasen der Transkription. Entsprechend sind Mutationen in dieser Domäne letal, so führt z.B. die Mutation des Thr4 in Valin oder Alanin zum Absterben der Zelle^{139,140}. Die CTD erstreckt sich wie ein Schwanz aus dem Kern der RNAP II und dient als Bindestelle für eine Vielzahl von Faktoren, welche transkriptionell relevante Modifikationen durchführen oder die RNA-Prozessierung steuern (*CTD-binding proteins*). Mehrere solcher Faktoren tragen eine charakteristische CTD-Bindungsdomäne CID (*CTD interacting domain*)¹⁴¹.

Die Vielzahl an möglichen Kombinationen der Modifikationen ergibt ein komplexes Muster an funktionellen Konformationen, welche die CTD einnehmen kann. So ist die RNAP II vor Initiation der Transkription am CTD unphosphoryliert (genannt RNAP IIA, hypo-phosphoryliert) und wird im Verlauf des Transkriptionszyklus vor allem am Ser2 und Ser5 stark phosphoryliert (genannt RNAP IIO, hyperphosphoryliert). Generell lässt sich erkennen,

dass nach der Initiation an der TSS eines Gens die Ser5 Positionen stark phosphoryliert (Ser5-P) sind, während Ser2 Positionen unphosphoryliert vorliegen. Während der Elongation bis zur Termination erfolgt die Phosphorylierung des Ser2 (Ser2-P) bei gleichzeitiger Dephosphorylierung der Ser5, so dass ein inverser Phosphorylierungsstatus vorliegt¹⁴². Verantwortlich für die Phosphorylierung dieser spezifischen Aminosäuren ist die Gruppe der CTD-Kinasen. Prominente Vertreter dieser Gruppe sind mehrere Cyclin-abhängige Kinasen, die CDKs (*cyclin dependend kinases*). Ser5 und auch Ser7 werden während der Initiation durch das CDK7/Cyclin H Heterodimer des TFIIH phosphoryliert^{143,144}. Ser2 und Thr4 in der elongierenden RNAP IIO werden durch das CDK9/Cyclin T1 Heterodimer, dem P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*), phosphoryliert^{139,145}. Weiterhin kann P-TEFb auch die beiden RNAP II Co-Repressoren DSIF und NELF phosphorylieren und die Elongation dadurch einleiten^{146,147}. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass es analog zu Hefeorganismen Hinweise auf andere, CDK9-ähnliche Kinasen wie CDK8 und CDK12 gibt, welche Ser2 phosphorylieren können. Deren genaue Rolle während der Transkription bedarf jedoch weiterer Untersuchung^{148,149}.

Die Erkenntnisse über das Netzwerk und die Interdependenz der CTD-Kinasen expandieren schnell und zeigen ein hochkomplexes Muster. So konnte gezeigt werden, dass CDK7 über seine Funktion gegenüber dem Ser5 auch die Rekrutierung von DSIF und TFIIIE steuert und auch für die Aktivierung des P-TEFb wichtig ist¹⁵⁰. BRD4, *bis dato* als P-TEFb Rekrutierungsfaktor betrachtet, zeigte überraschend atypische Kinaseaktivität gegenüber der CTD und konnte Ser2 phosphorylieren¹⁵¹. Darüber hinaus scheint BRD4 die CDK9 mengenabhängig entweder aktivierend oder inhibierend zu phosphorylieren und kann wiederum durch CDK7-vermittelte Phosphorylierung inhibiert werden. Zusätzlich scheint TAF7 generell diese Kinasen zu reprimieren¹⁵². Ebenso kann das Cdc2/cyclin B Heterodimer über Pin1 (*peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1*) den CTD in der M-Phase des Zellzyklus hyperphosphorylieren (genannt RNAP IIOO) um die Transkription in der Mitose zu reprimieren¹⁵³. Es ist eindeutig, dass intensive Forschung auf dem Gebiet der CTD-Kinasen nötig ist, um die komplexen Vorgänge aufzuklären und jeder Kinase ihre korrekte Rolle im richtigen Kontext zuzuweisen.

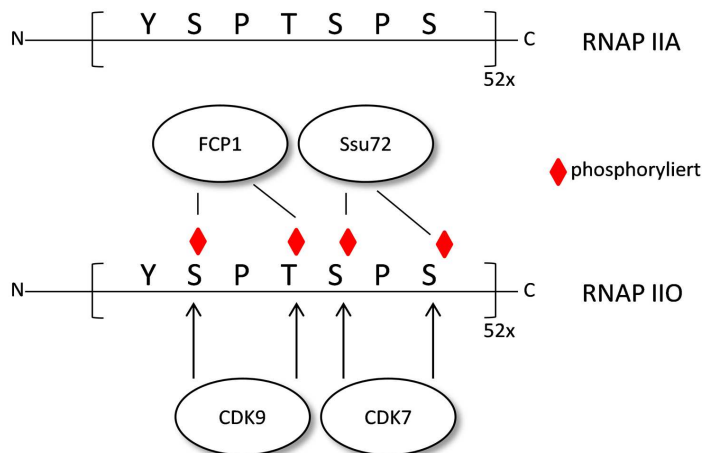
Erwartungsgemäß konnten auch Phosphatasen identifiziert werden, die das Phosphorylierungsmuster des CTD beeinflussen. Sie bilden den Gegenpart zu den CTD-Kinasen und sorgen u.a. für die Bereitstellung der RNAP IIA zu Beginn der Transkription. Fcp1 (*TFIIF-associating CTD phosphatase 1*) dephosphoryliert die elongierende RNAP IIO und bereitet sie auf die Assemblierung des PIC vor. Sie kann sowohl Ser2 als auch Ser5 dephosphorylieren, zeigt aber eine Präferenz für Ser2-P. Entsprechend wird Fcp1 vor allem in promotordistalen Bereichen gefunden und ist essentiell für eine produktive Transkription

¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Komplementär dazu dephosphoryliert das humane Ssu72 vorrangig Ser5-P und ist in promotorproximalen Bereichen des transkribierten Gens zu finden^{157,158}. Ssu72 interagiert mit Symplekin und wird mit Polyadenylierung und der Formation der 3'-Enden der RNA assoziiert und weist auf die Stellung des CTD als Bindeglied zwischen Transkription und Polyadenylierung hin¹⁵⁹. Darüber hinaus wurde erst kürzlich eine *in vitro* Phosphataseaktivität des Ssu72 gegenüber Ser7-P gezeigt¹⁵⁸.

Das oben beschriebene Muster der CTD-Phosphorylierung während der Elongation hat mit Erweiterung des Ser7 und Thr4 in mehreren Genom-weiten ChIP-Studien seine Gültigkeit gezeigt¹⁶⁰⁻¹⁶². Die Verteilung der Ser7-Phosphorylierung überlappt mit der des Ser5 und weist darauf hin, dass beide Positionen zu Beginn der Transkription durch CDK7 phosphoryliert und im Verlauf der Elongation entfernt werden¹⁶³. Ebenso besteht eine hohe Ähnlichkeit zwischen dem Thr4-P und Ser2-P Muster, welche beide mit fortschreitender Transkription durch CDK9 erstellt werden¹⁴⁰. Ser5-P/Ser7-P zeigt somit sein Maximum an der TSS und wird zum 3'-Ende graduell dephosphoryliert, während Ser2-P ansteigt, bei Nukleotid +600 vollständig etabliert ist und ~100 bp nach der Polyadenylierungssequenz einbricht. Die Überlappung zwischen Ser5-P und Ser2-P hat ihr Maximum bei bp +450. Dieser Effekt ist unabhängig von der Länge des Gens und führt somit zu unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern zwischen langen (Ser2-P reichen) und kurzen (Ser5-P reichen) Genen¹⁶². Weitere Untersuchungen bezüglich Ser7-P haben hier jedoch eine Kontroverse aufgerufen. So wurde diese Modifikation auch in terminal pausierter RNAP II gefunden und funktionell mit der Prozessierung der 3'-Enden der RNA assoziiert¹⁶³. Sie scheint daher bivalent aufzutreten, mit Maxima im Promotor und den terminalen Sequenzen des Gens.

2. Einleitung

A



B

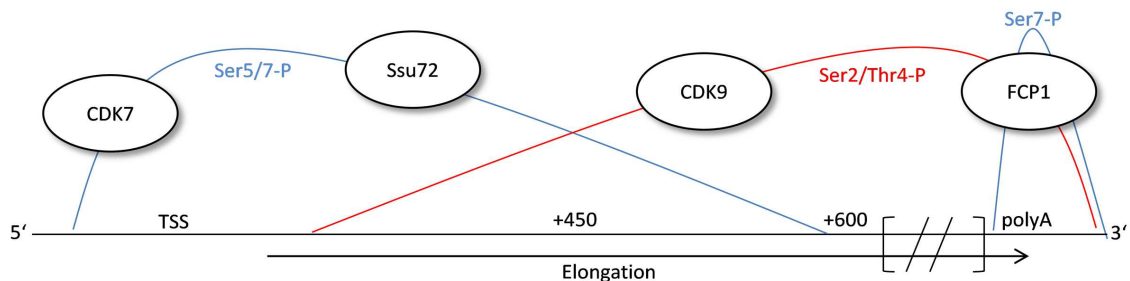


Abbildung 2.1.4.1. Modifikation der CTD der RNAP II. (A) Schematische Darstellung der CTD der RNAP II in der hypophosphorylierten (RNAP IIA) und hyperphosphorylierten (RNAP IIO) Form und der für die post-translationalen Modifikationen zuständigen Kinasen (CDK7/9) und Phosphatasen (FCP1/Ssu72). (B) Die mittlere Verteilung der Modifikationen über den Genkörper während der Transkription. Das Maximum der Ser5/7-Phosphorylierung ist an der TSS (bp +1) zu finden und wird graduell verringert. Bei bp +450 erfolgt die größte Überschneidung mit der Ser2/Thr4-Signatur, die erst bei bp +600 vollständig etabliert ist.

An dieser Stelle soll nur kurz auf die Bedeutung der CTD-Modifikationen für epigenetische Effekte der Transkription eingegangen werden, eine detaillierte Beschreibung der Rolle der Epigenetik in der Transkription folgt an anderer Stelle (siehe Kapitel 2.1.9.). Ser5-P vermittelt die Bindung der CTD an Wdr82 (*WD repeat domain 82*), welches die H3K4-Histonmethyltransferasen Set1A und Set1B zur RNAP II rekrutiert¹⁶⁴. Gleiches wurde für MLL1 und MLL2 (*mixed lineage leukemia*) beschrieben¹⁶⁵. Zusätzlich bindet HYPB (*Huntington-interacting protein*) an Ser2-P/Ser5-P und kann H3K36 methylieren¹⁶⁶. Der Elongationsfaktor Spt6 (*suppressor of Ty 6 homolog*) bindet ebenfalls an Ser2-P und rekrutiert Iws1, welches die Bindung von HYPB verstärkt^{167,168}.

Die CTD der RNAP II besitzt eine weitere Funktion, welche die Transkription direkt mit der Prozessierung der RNA, also 5'-Capping, Spleißen und 3'-Endenprozessierung, verknüpft. Die CTD ist essentiell für die Prozessierung und benötigt mindestens die N-terminale Hälfte der 52 Wiederholungen zusammen mit den C-terminalen zehn Aminosäuren N-

ISPDDSDEEN-C, welche für die Stabilität des Rpb1 wichtig sind¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Das 5'-Capping erfolgt nur bei den Transkripten der RNAP II und unmittelbar nach dem Verlassen der gebildeten RNA aus dem katalytischen Zentrum¹⁷². Ein bifunktionelles Cappingenzym mit RNA-triphosphatase- und Guanylyltransferase-Aktivität bindet über die Transferasedomäne spezifisch an Ser2-P sowie allosterisch an Ser5-P und führt zur Ausbildung des Enzym-GMP Intermediates¹⁷³. Eine so modifizierte prä-mRNA ist für die folgende Translation stabilisiert und kann zu mRNA reifen. Das speziell die RNAP II über deren CTD eine direkte Einflussnahme auf das Capping vornimmt ist nachvollziehbar, da die Transkripte der RNAP II aus Klasse-II-Genen vergleichsweise länger und somit instabiler als jene der RNAP I und III sind.

Die Rekrutierung von funktionellen Faktoren über die CTD spielt auch während des alternativen Spleißens eine Rolle. RNAP IIO, aber nicht RNAP IIA, ist in die Assemblierung des Spleißosoms involviert und interagiert über die CTD mit SRSF2 (*serine/arginine-rich splicing factor 2*)¹⁷⁴. Weitere bindende Faktoren sind PRP40 (*pre-mRNA processing factor 40 homolog*, unterstützt die Erkennung der 5'-Spleißstelle) und U2AF (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor*, definiert die 3'-Spleißstelle), welche das Spleißosom zu den Enden der Introns dirigieren können. Einhergehend damit kann der aktivierende PRP19 Komplex über U2AF zur RNAP IIO rekrutiert werden^{175,176}. Auch diese Funktion der CTD ist sinnvoll wenn man berücksichtigt, dass ein intaktes Spleißosom und Spleißstellen für die Elongation und Termination notwendig sind^{177,178} und diverse Spleißfaktoren wie SKIP (*c-Ski-interacting protein*) und SRSF2 die Elongation verstärken^{179,180}. Schlussendlich ist auch die Prozessierung der 3'-Enden im Sinne der Polyadenylierung durch die CTD reguliert. Sie assoziiert mit zwei Polyadenylierungsfaktoren, CPSF (*cleavage and polyadenylation specific factor*) und CstF (*cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA*) und konnte *in vitro* autonom von der RNAP II Polyadenylierung vermitteln^{169,181}. In diesem Prozess spielt Ser2-P eine wichtige Rolle. Eine Inhibition von P-TEFb mittels Flavopiridol vermindert die Rekrutierung obiger Faktoren zur CTD und genom-weite ChIP-Experimente zeigten, dass das Muster an Ser2-P mit der Lokalisierung dieser Faktoren über das transkribierte Gen übereinstimmt^{162,182}.

Für die Termination der RNAP II wird ein funktionelles Polyadenylierungssignal und damit die Prozessierung des 3'-Endes der RNA benötigt¹⁸³, weshalb im Hinblick auf die oben beschriebenen Interaktionen eine Beteiligung der CTD nachvollziehbar ist¹⁶⁹. Die Entdeckung, dass die Spaltung der RNA am 3'-Ende entscheidend ist, führte zu einem Modell, in dem eine 5'-3'-Exoribonuklease die strangabwärts freiwerdende, nicht-gecappte RNA degradiert und so der RNAP II die Termination vermittelt¹⁸⁴. Im Menschen wird diese Rolle durch Xrn2 übernommen, es bindet an das p54/PSF-Dimer, welche wiederum an die CTD binden und dem Prozessierungskomplex zugeordnet wird¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Vermutlich kooperiert

Xrn2 mit der RNA-DNA-Helikase Senataxin. Senataxin bindet an Ser2-P und kann die RNA-DNA-Hybride (*R-loops*) strangabwärts des Polyadenylierungssignals auflösen und so Xrn2 den Zugang zur RNA ermöglichen^{188,189}.

Eine post-translationale Modifikation der RNAP II über die CTD hinaus ist die Ubiquitylierung des Enzyms. Diese tritt unter physiologischen Bedingungen nur auf einem basalen Level auf, wird aber im Falle zellulärer Stresssituationen wie DNA-Schädigungen oder eines Elongationsblocks stark erhöht. Eine so arretierte RNAP II assoziiert mit Faktoren des NER (*nucleotide excision repair*)-Signalwegs wie CSA und CSB (*Cockayne syndrome A and B*) und wird schnell und langanhaltend ubiquityliert, man spricht hier von einer Transkriptions-gekoppelten Reparatur (TCR, *transcription-coupled repair*). Der gleiche Prozess kann auch über den BER (*base excision repair*)-Signalweg ablaufen, allerdings unabhängig von CSA und CSB^{190,191}. Bei einer zu starken Schädigung der DNA kann eine verstärkte Ubiquitylierung der RPB1 induziert und so die proteasomale Degradation der RNAP II durch das 26S-Proteasom veranlassen werden^{191,192}. In Säugerzellen wurden mehrere CTD-abhängige E3-Ubiquitin-Ligasen identifiziert, welche diese Aufgabe wahrnehmen. So bindet beispielsweise hRPF1 (*human receptor potentiation factor 1*) an das PXY-Motiv der CTD¹⁹² und pVHL (*von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*) sowie BRCA1 (*breast cancer gene-1 encoded protein*) benötigen u.a. eine hyperphosphorylierte CTD zur Bindung an Rpb1^{193,194}. Dementsprechend führt eine Inhibition der Phosphorylierung von Ser2 und Ser5 durch den CTD-Kinase Inhibitor H8 zur Unterdrückung der Ubiquitylierung der RNAP II¹⁹⁵.

2.1.5. Generelle Transkriptionsmaschinerie

Die RNA-Polymerasen sind nicht in der Lage die TSS einzelner Gene korrekt zu erkennen. Für eine sequenzspezifische und auch genspezifische Erkennung benötigen sie eine Gruppe zusätzlicher Faktoren um die Initiation einzuleiten. Diese Faktoren werden als generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) bezeichnet und besitzen eine feste Nomenklatur. Sie werden entsprechend ihrem Erscheinen in der Säulenchromatographie als TFIIA, B, D, E, F und H (*transcription factor, pol II driven transcription, chromatographic fraction A, B, D, E, F, H*) bezeichnet¹⁹⁶. Die Kombination aus der RNAP II und den GTFs wird als der Prä-Initiationskomplex (PIC) bezeichnet. Die Architektur des Kernpromotors ist für die Assemblierung des PIC entscheidend, die Elemente des Kernpromotors und die entsprechenden Interaktionen sind in Kapitel 2.1.3. beschrieben. Der genaue Ablauf der Assemblierung des PIC ist noch nicht geklärt.

Unabhängig vom favorisierten Modell ist der erste Schritt für den PIC die Bindung von TFIID an den Kernpromotor. Der humane TFIID-Multiproteinkomplex von ~750 kDa beinhaltet

neben dem 38 kDa TBP weitere TAFs zwischen 250 und 15 kDa^{197,198}, welche distinkte Promotorelemente (TATA-Box, Initiator, DCE etc.) erkennen und so sowohl an TATA-Box- als auch TATA-lose Promotoren binden^{50,199}. Der stark konservierte C-Terminus des TBP bindet an die TATA-Box in der kleinen Furche der DNA-Helix und induziert eine starke Konformationsänderung seiner selbst als auch der DNA. TBP bildet eine konkave "Sattel"-Struktur (*saddle*) mit einer zweiteiligen DNA-Bindungsfläche mit je fünf β -Faltblättern und einer α -Helix ("Steigbügel", *stirrup*)²⁰⁰. Durch die Interkalation von Phe284/Phe301 am 5'- und Phe193/Phe210 am 3'-Ende der TATA-Box kommt es zur Ausbildung scharfer Knicke in der DNA, welche die kleine Furche öffnen und die große Furche komprimieren²⁰¹. Um unspezifische DNA-Bindung zu minimieren und damit die Frequenz korrekter Initiation zu erhöhen kann das TBP (respektive TFIID) Homodimere bilden, welche die DNA-Bindungsdomäne maskieren^{200,202}. Zusätzlich kann TAF1 (TAF_{II}250) über zwei N-terminale Domänen (TAND1, TAND2) eine analoge Blockade des TBP bewirken und die Assoziation mit TFIIA und TFIIB unterbinden^{203,204}. Die exakten Mechanismen und Interdependenzen dieser Faktoren in der Regulation der Promotorerkennung durch TBP sind komplex und Gegenstand intensiver Forschung^{205,206}, sollen an dieser Stelle aber nicht näher ausgeführt werden.

Neben den genannten repressiven Faktoren gibt es erwartungsgemäß auch Aktivatoren, welche die Ausbildung des TBP-TATA-Komplex unterstützen. TFIIA und TFIIB verstärken die Bindung des TBP an die TATA-Box, so fördert TFIIA die Auflösung der TBP-Homodimere²⁰⁷, konkurriert mit TAF1 um die Bindung an TBP²⁰⁴ und blockiert die Dissoziation des TBP-TATA-Komplex durch BTAF1²⁰⁸. Analog dazu verstärkt TFIIB die Bindung des TBP an die TATA-Box und stabilisiert die gebogene Konformation der DNA^{209,210}. Damit die Bindung des TBP jedoch grundlegend stattfinden kann, muss die DNA für das Protein zugänglich sein. Daher ist die Gruppe der chromatinmodifizierenden Enzyme wichtig für eine Ausbildung des TBP-TATA-Komplex und darauf folgend des PIC. Wenn der Promotor in einem Nukleosom lokalisiert ist, muss die periphere Chromatinstruktur erst aufgelockert werden um Zugang zu gewähren. Dies geschieht am Beispiel des β -Interferon Promotor zum Einen durch ATP-abhängige Chromatin-Remodellierung von Faktoren der SWI/SNF-Helikasen und zum Anderen durch Acetylierung des N-Terminus der Kernhistone mittels der Histonacetyltransferase GCN5 (KAT2A, *K(lysine)-acetyltransferase 2A*), welche beide Mitglieder des PIC sind^{11,211}.

Trotz seiner Abhängigkeit von einer Vielzahl an Cofaktoren hat TFIID über die Promotorbindung durch TBP hinaus eine beachtliche Summe an weiteren, enzymatischen Funktionen in der Initiation. So ist TAF1 eine Histonacetyltransferase (HAT), welche zumindest *in vitro* die Histone H3 und H4 acetylieren kann und damit vor allem für die

Transkription nukleosomal blockierter Promotoren eine wichtige Rolle spielt^{212,213}. TAF1 verfügt dafür über zwei Bromodomänen, welche die acetylierten Lysine H3K14 sowie H4K5, K8, K12 und K16 erkennt^{214,215}. Weiterhin sorgt TAF1 u.a. für die Acetylierung von TFIIE β ²¹⁶ und die Phosphorylierung von Ser33 des Histon 2B, welche mit der Aktivierung assoziierter Gene korreliert²¹⁷. Durch seine Interaktion mit verschiedenen Aktivatoren trägt das humane TAF7 zu der Rolle des TFIID als potenter Coaktivator bei. TAF7 interagiert über seinen N-Terminus mit SP1, YY1 (*ying yang 1*), USF (*upstream transcription factor*), CTF (*CCAAT box-binding transcription factor*) sowie den viralen Faktoren E1A und HIV-1 Tat und dient so als Brücke zwischen diesen Faktoren und den GTFs²¹⁸. Solche Faktoren können dann die Bindung des TFIID an Kernpromotorregionen vermitteln und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PIC-Assemblierung kontrollieren²¹⁹. Da TAFs auch in der Lage sind, andere GTFs zu kontaktieren, erlauben sie nach der korrekten Bindung an den jeweiligen Promotor den Eintritt der anderen GTFs als auch der RNAP II in den PIC. So wurden Interaktionen sowohl zu TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF als auch zu Rpb1 und Rpb2 beschrieben²¹⁹⁻²²³.

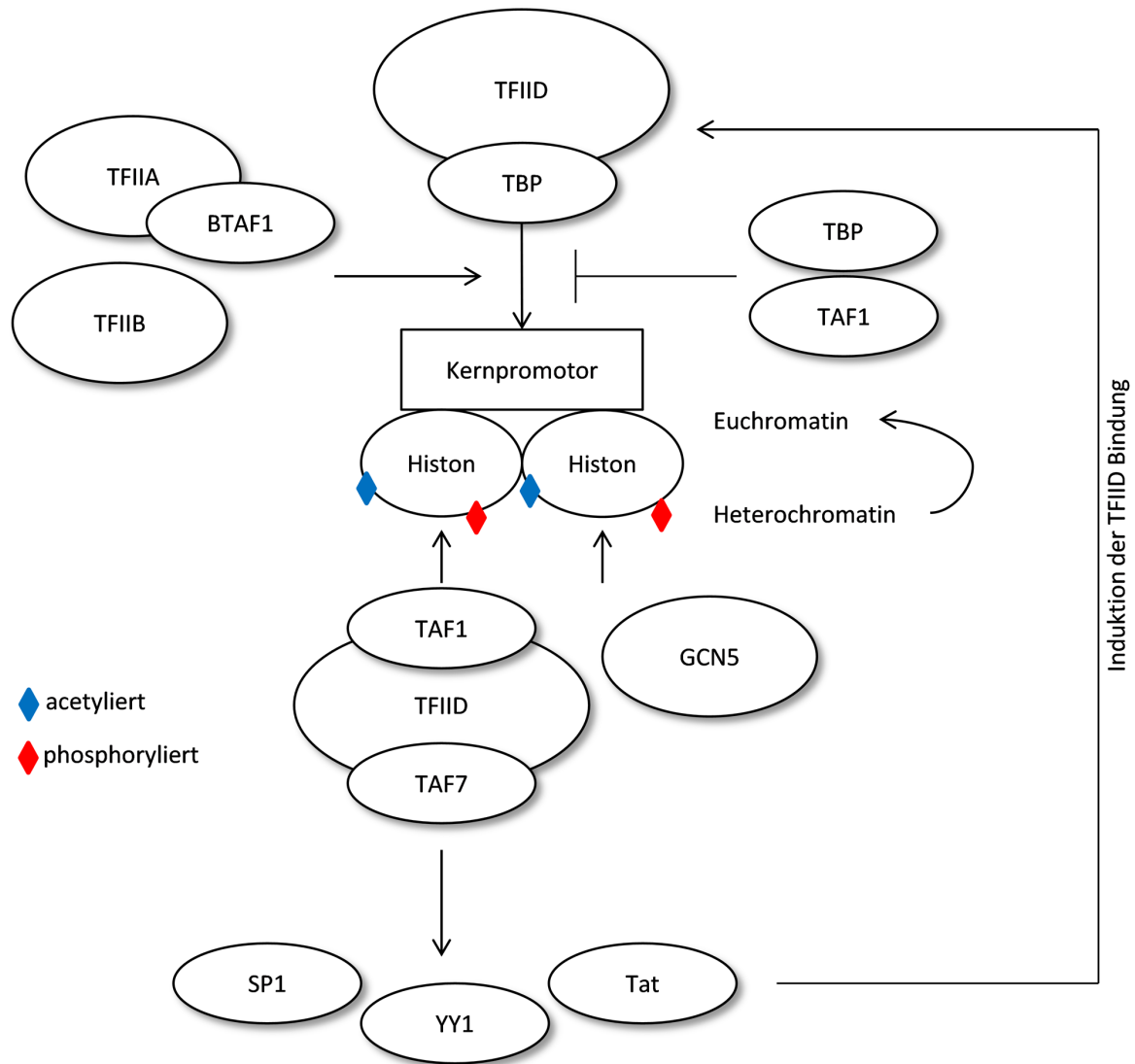


Abbildung 2.1.5. Induktion der Bindung von TFIIID an den Kernpromotor - Rolle der GTF. Die Bindung der TFIIID an den Kernpromotor erfolgt über TBP. Diese Bindung wird durch TBP oder TAF1 durch Dimerisierung blockiert und durch TFIIA und TFIIB durch Konkurrenz begünstigt. Vor der Bindung müssen die assoziierten Nukleosomen durch Remodellierung und post-tranlationale Modifikation zugänglich gemacht werden, es kommt zur Bildung von Euchromatin durch SWI/SNF-Helikasen, GCN5 und TAF1. TAF7 des TFIID bindet dann an Transkriptionsfaktoren wie SP1, YY1 oder auch HIV-1 Tat und leitet so den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der TFIIID-Kernpromotor-Bindung ein. Weitere GTFs werden dann sequentiell rekrutiert.

Das humane TFIIA besteht aus der α -, β - und γ -Untereinheit (35 kDa, 19 kDa und 12 kDa), wobei $TFIIA_{\alpha\beta}$ als 55 kDa Vorläuferprotein translatiert und am Asp278 in die α - und β -Untereinheit proteolytisch gespalten wird^{220,224}. TFIIA dient vorrangig als ein Antirepressor, der inhibitorische Effekte auf die Promotorbindung des TBP/TFIID aufhebt (s.o.). Es kann sowohl durch TAF1 (Phosphorylierung von $\alpha\beta$ Ser316 und $\alpha\beta$ Ser321) als auch durch p300 (Acetylierung) transkriptionell aktiviert werden^{225,226}. Zusätzlich interagiert TFIIA in seiner Rolle als Coaktivator mit anderen Cofaktoren wie PC4²²⁷, Komponenten des TFIID²²⁸ und weiteren GTFs wie TFIIE²²⁹. Es beeinflusst damit maßgeblich die Assemblierung des PIC, ist

jedoch nachweislich nur für die Transkription spezifischer Gengruppen notwendig und nicht universell an der Transkription beteiligt²³⁰.

Humanes TFIIB ist ein 33 kDa Protein, welches nach der Ausbildung des TFIID-DNA-Komplexes unabhängig von der Anwesenheit des TFIIA bindet und den Komplex stabilisiert. TFIIB ist entscheidend für die anschließende Rekrutierung der RNAP II und TFIIIF und die Definition der TSS^{134,231,232}. TFIIB besitzt zwei funktionelle, hochkonservierte Domänen: Die N-terminale RNAP II/TFIIIF-interagierende Zinkfingerdomäne und die C-terminale DNA-Bindungsdomäne. Mittels dieser C-terminalen Domäne interagiert TFIIB sowohl mit TFIIIF/TBP als auch mit Sequenzen des Kernpromotors proximal der TATA-Box²³³. Die N-terminale Zinkfingerdomäne interagiert hingegen mit Rpb1 und Rpb2 der RNAP II²³⁴ und mit RAP30 des TFIIIF²³⁵ und eröffnet so die nächste strukturelle Ebene des PIC. Direkt benachbart der Zinkfingerdomäne liegt eine CC-Domäne (CCD, *charged cluster domain*), auch B-Finger genannt, die als molekularer Schalter die Konformation des TFIIB steuert und so seine Funktion zwischen Erkennung des Kernpromotors, Definition der TSS und Aktivierung der Transkription wechselt^{236,237}. Über den B-Finger, der in die zentrale Spalte der RNAP II hereinragt, wird die Promotor-DNA in das katalytische Zentrum der RNAP II geleitet und damit die TSS definiert^{234,236}. TFIIB interagiert weiterhin in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus mit den terminalen hCPSF- (*cleavage and polyadenylation specific factor*) und CstF- (*cleavage stimulation factor*) Komplexen und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Ausbildung der DNA-Schleifen und der Re-Initiation der RNAP II^{46,238}.

TFIIIF ist eine hochgradig multifunktionelle Komponente des PIC, die ein umfassendes Netzwerk an Interaktionen bereitstellt. TFIIIF besteht aus einem Heterotetramer von je zwei Einheiten seiner Untereinheiten RAP30 und RAP74 (*RNA polymerase II-associated proteins*)²³⁹. RAP30 besitzt eine zentrale RNAP II/Rpb5-interagierende Domäne und eine kryptische "*winged helix-turn-helix*" DNA-Bindungsdomäne. Am N-Terminus befindet sich eine weitere Domäne zur Interaktion mit RAP74 und TFIIB^{240,241}. RAP74 selbst hat drei funktionelle Domänen, die es zur Interaktion mit RAP30, TAF1, TFIIA $\alpha\beta$, TFIIB, der RNAP II und der Phosphatase FCP1 (*F-cell production 1*) befähigen^{223,229,240}. Die multiplen Interaktionen zwischen TFIIIF und anderen Faktoren des PIC tragen zur korrekten Assemblierung, Initiation und Elongation der RNAP II bei²⁴². RAP74 besitzt weiterhin eine zu RAP30 analoge DNA-Bindungsdomäne, die unspezifisch an doppelsträngige DNA zwischen der TATA-Box und dem INR bindet und damit die Kontakte zwischen PIC und Promotor erheblich erweitert^{243,244}. Überlappend mit dieser Domäne finden sich die Bindungsstellen für die RNAP II sowie TFIIB, TFIIA $\alpha\beta$ und FCP1. Interessanterweise können die RNAP II und FCP1 simultan an RAP74 binden. In diesem Kontext ermöglicht die Interaktion zwischen

RAP74 und FCP1 die Dephosphorylierung des Ser2-P der CTD zwecks der Regeneration der RNAP IIA. Dementsprechend ist ein funktionelles RAP74 essentiell für multiple Transkription einer RNAP II *in vitro*^{42,240,245}. Die grundlegenden Funktionen des TFIIF sind damit die Rekrutierung der RNAP II zu dem TFIID-TFIIB-Komplex über die RAP30/Rpb5 Interaktion^{246,247}, eine weitere Stabilisierung und Protektion des promotorgebunden Komplex durch die extensiven DNA-Kontakte, welche eine RNAP II-umwickelnde Topologie fördern^{244,248} und die Rekrutierung von TFIIE und TFIIH.

Auch TFIIE ist ein multifunktioneller Faktor, der umfangreiche Interaktionen im PIC vermittelt. TFIIE besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, die ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer bilden. Humanes TFIIE α ist ein 56 kDa Protein, dessen N-Terminus für die Interaktion mit TFIIE β und der RNAP II zuständig ist. Er spielt zusätzlich eine Rolle in der basalen Transkription und für die über TFIIH vermittelte Phosphorylierung der CTD. Der C-Terminus bindet an TFIIH selbst und ermöglicht damit dessen Eintritt in den PIC. TFIIE ist damit in der Transition von Initiation zur Elongation beteiligt²⁴⁹⁻²⁵². Die kleinere Untereinheit, TFIIE β , besitzt analoge Funktionen. Über dessen N-terminale, Serin-reiche Domäne kann ebenfalls die CTD-Phosphorylierung durch TFIIH verstärkt werden. Weiterhin wurden eine DNA-Bindedomäne für doppelsträngige DNA (sowie eine C-terminale Domäne mit zwei basischen Regionen identifiziert. Die erste dieser basischen Regionen besteht aus einem Helix-Schleife-Helix Motiv und kann mit TFIIE α als auch anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. Die zweite Region interagiert hingegen mit der RNAP II, TFIIB, RAP30 und auch einzelsträngiger DNA^{253,254}. Die Bindung an einzelsträngige DNA²⁵² im Verlauf der Transkription zeigt, dass TFIIE in der Tat spät in die Assemblierung des PIC eingreift und strangabwärts zu anderen beschriebenen GTFs lokalisiert ist. Dementsprechend ist der C-Terminus des TFIIE β auch wichtig für die Transition zur Elongation²⁵⁵. TFIIE bindet sowohl nahe des aktivem Zentrums der RNAP II als auch ca. 10 bp strangaufwärts der TSS und unterstützt in Zusammenarbeit mit TFIIH das Aufschmelzen des Promotors^{243,256}. Diese Öffnung der Promotorstruktur ermöglicht es der RNAP II auf der Matrize voranzuschreiten und mit der Synthese der RNA zu beginnen. Diese Funktion scheint die dominante Rolle des TFIIE zu sein, da bereits aufgeschmolzene Promotoren auch in Abwesenheit dieses GTFs transkribiert werden können²⁵⁷.

Der letzte GTF in der Assemblierung des PIC ist der komplexe und hochfunktionelle TFIIH^{258,259}, der durch TFIIE zum Promotor rekrutiert wird. TFIIH besteht historisch aus neun Untereinheiten, die funktionell in zwei Subkomplexe eingeteilt werden. So wurden der Cyclin-aktivierende Kinase-Komplex (CAK, *cyclin-activating kinase complex*) und der Kernkomplex (*core complex*) definiert. Der CAK besteht aus CDK7/Cyclin H und MAT1 und phosphoryliert die CTD der RNAP II wie bereits beschrieben²⁶⁰. Der Kernkomplex besteht aus den XPB und

XPD Helikasen (*gene defective in xeroderma pigmentosum patients complementation group B and D*), p62, p52, p44 und p34. Beide Subkomplexe werden durch die XPD Helikase des Kernkomplexes strukturell verbunden²⁶¹. Erst wesentlich später wurde TFB5 als zehnte Untereinheit identifiziert, welches neben einer Funktion in der DNA-Reparatur eine stabilisierende Rolle auf TFIIH ausübt und in vitro die ATPase Aktivität der XPB Helikase stimuliert^{262,263}. Die DNA-abhängigen ATPasen des TFIIH erlauben die stabile Öffnung der Promotorstruktur und die Ausbildung der ersten Phosphodiesterbrücken in der entstehenden RNA seitens der RNAP II^{256,264,265}. In Abwesenheit des TFIIH blockiert die RNAP II proximal zum Promotor (*stalled RNAP II*) und kann nicht in die produktive Elongation übergehen. Interessanterweise ist TFIIH funktionell jedoch nicht mehr relevant, sobald die RNAP II erfolgreich den Promotor verlassen hat^{257,266}. Ein entscheidender Faktor in der Funktion des TFIIH ist die XPB 3'-5'-Helikase, die essentiell für das Verlassen des Promotors ist²⁶⁷. TFIIH steht in intensiver Wechselwirkung mit Coaktivatoren der Transkription wie RARs (*retinoic acid receptors*) oder E2F1 (*E2F transcription factor 1*), die einerseits zur dessen Rekrutierung als auch zu post-translationaler Phosphorylierung der Coaktivatoren führt^{267,268}.

2.1.6. Generelle Cofaktoren - Mediator und USA-Cofaktoren

Generelle Cofaktoren bilden die Verbindung zwischen genspezifischen Transkriptionsfaktoren und der generellen Transkriptionsmaschinerie, die im vorigen Kapitel beschrieben wurde. Eine Gruppe dieser Cofaktoren, die TAFs des TFIID, wurden bereits ausführlich dargestellt. Darüber hinaus gibt es zwei Gruppen, die ungleich den TAFs nicht direkt dem PIC angehören, für die Transkription jedoch unerlässlich sind. Es handelt sich dabei um die CTD-assoziierten Mediatorkomplexe²⁶⁹ und die USA (*upstream stimulatory activity*)-abgeleiteten positiven (PC1-4) und negativen (NC1) Cofaktoren²⁷⁰.

Die humanen Mediatorkomplexe bilden Multiproteinkomplexe, deren einzelne Untereinheiten als MED1 bis MED31 bezeichnet werden. Die einzige Ausnahme bildet das CDK8/CycC-Dimer²⁷¹. Der erste humane Mediatorkomplex wurde 1996 assoziiert mit dem Thyroidhormonrezeptor TR α (*thyroid hormone receptor α*) gereinigt und TRAP (*TR α -associated protein complex*) getauft²⁷². Einzelne Untereinheiten dieses Komplexes wurden in der Folge jedoch auch in anderen Komplexen wie dem SMCC (*SRB/MED-containing cofactor complex*)²⁷³, DRIP (*vitamin D receptor-interacting protein complex*)²⁷⁴ oder NAT (*negative regulator of activated transcription*)²⁷⁵ identifiziert. Die Mediatorkomplexe können in große (Mediator-P.5, eluiert in der 0,5M KCl Fraktion) und kleine (Mediator-P.85, eluiert in der 0,85M KCl Fraktion) Komplexe unterteilt werden. Ein wesentlicher struktureller Unterschied ist das Vorhandensein des MED12-MED13-CDK8-CycC Moduls in den großen Komplexen sowie das Auftreten von MED26 in den kleinen Komplexen²⁷¹. Die

elektronenmikroskopische Betrachtung verschiedener Mediator Komplexe zeigte jedoch das Auftreten einer übergreifenden strukturellen Organisation, die eine Definition von drei verschiedenen Domänen erlaubte²⁷⁶⁻²⁷⁸. Diese Domänen, die als "*head module*", "*middle module*" und "*tail module*" bezeichnet werden, sind in der Lage in Abhängigkeit zu ihren Bindungspartnern verschiedene funktionelle Konformationen einzunehmen²⁷⁹⁻²⁸¹. Im Falle der Bindung der RNAP II über MED17, MED18, MED20 und MED22 kommt es zur Konformationsänderung, welche den Komplex in eine Bogenform überführt und die RNAP II am "vorderen" Ende dieses Bogens platziert²⁷⁶. Zusätzlich binden Aktivatoren an MED17 und MED18 und können so die induzierte Rekrutierung der RNAP II unterstützen^{273,282}. Die weiteren Module vermitteln zusätzliche Kontakte zu der RNAP II, ohne jedoch die DNA-Bindung oder die Bindestellen anderer GTFs oder Cofaktoren zu verdecken, sowie zu anderen Coaktivatoren wie nukleären Rezeptoren^{283,284}. Ein entscheidender Unterschied zwischen den kleinen und den großen Mediator Komplexen ist das freiständige MED12-MED13-CDK8-CycC Modul²⁸⁵. Dieses Modul kontaktiert in großen Komplexen das mittlere und das Kopfmodul durch Interaktionen zwischen CDK8/MED1/MED4 und MED13/MED17^{286,287}. Es wirkt transkriptionell reprimierend durch Phosphorylierung des Ser2 und Ser5 in der CTD der RNAP II vor der Assemblierung des PIC sowie Ser5 und Ser304 des CyclinH im TFIIH^{143,285,288}. Mediator Komplexe wirken intrinsisch sowohl auf die basale als auch die Aktivator-abhängige Transkription, wobei die kleinen Komplexe jedoch nur die basale Transkription zu aktivieren vermögen²⁸⁹⁻²⁹¹.

Als letzte Gruppe der Cofaktoren sollen an dieser Stelle die USA-abgeleiteten Cofaktoren vorgestellt werden. Eine grundlegende Gemeinsamkeit dieser Faktoren ist, dass sie in der Aktivator-abhängigen Transkription verstärkend wirken, die basale Transkription aber in Abwesenheit eines Aktivators reprimieren. PC1 ist ein nukleäres Protein und ein funktionelles Äquivalent von PARP-1²⁹², welches in erster Linie mit Mechanismen der DNA-Reparatur und der Apoptose assoziiert wird. PARP-1/PC1 katalysiert die Übertragung einer ADP-Ribose Einheit von NAD⁺ auf ein Akzeptor-Protein^{293,294}, wozu auch eine Vielzahl der beschriebenen, in der Transkription involvierten, Faktoren wie TBP, RNAP II, RAP30, RAP74, YY1, SP1 sowie Histone und andere USA-abgeleitete Cofaktoren sind²⁹⁴⁻²⁹⁶. Seine coaktivierende Funktion erfüllt PARP-1 durch Interaktion mit zahlreichen, distinkten Aktivatoren wie E2F-1²⁹⁷, E2 des humanen Papillomavirus Typ 18²⁹⁸ oder NFκB²⁹⁹ sowie mit anderen Coaktivatoren wie p300, HDACs oder CDK8/MED14 des Mediator Komplexes^{300,301}. Darüber hinaus kann PARP-1 umfangreich post-translational modifiziert werden, so führt dessen Phosphorylierung durch CaMKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) als auch Acetylierung durch p300 zu einer genspezifischen Aktivierung der Transkription^{300,302}. PARP-1 ist ebenfalls in der Lage, das reprimierende CDK8 Modul großer Mediator Komplexe aus diesen zu entfernen³⁰¹. Gemäß seiner bivalenten Rolle besitzt PARP-1 auch

Mechanismen, welche die basale Transkription reprimieren. Über seine N-terminale DNA-Bindungsdomäne kann es in das Chromatin inkorporiert werden und führt zur Ausbildung kondensierten Heterochromatins, welches für die Transkriptionsmaschinerie nicht zugänglich ist³⁰³. Weiterhin sorgt es für die Integrität, aber auch Dissoziation, von Corepressorkomplexen (TLE1) durch Modifikation derer Komponenten³⁰² und kann durch die ADP-Ribosylierung von Transkriptionsfaktoren wie p53, YY1 oder SP1 die Bindung an deren Erkennungssequenzen verhindern^{296,304,305}.

PC2 (USA100)³⁰⁶ entspricht den kleinen Mediatorkomplexen (s.o.) und funktioniert nur kooperativ mit TAFs sowie PC3 und PC4 als Coaktivator der Transkription in einer Reihe von Signaltransduktionswegen, z.B. von NFκB oder SP1^{307,308}. PC3 ist das Äquivalent der DNA-Topoisomerase I (Topo I), die zur Relaxation der DNA mittels Einführung von Einzelstrangbrüchen befähigt ist^{309,310}. Sie kann über ihren N-Terminus Transkriptionsfaktoren wie p53 binden³¹¹ und ist wiederum ein Akzeptorprotein für PARP-1, welches durch seine enzymatische Aktivität Topo I von der DNA dissoziieren kann³¹². Durch seine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und TBP³¹³ sowie die Fähigkeit, die Formierung des TFIID-TFIIA-Promotor-Komplexes zu verstärken³¹⁴, kann PC3/Topo I aktivierend auf die Transkription wirken.

Der letzte USA-abgeleitete positive Cofaktor, PC4, ist in zwei funktionelle Domänen aufgeteilt. Die N-terminale Domäne dient der Interaktion mit anderen Aktivator-Domänen sowie der nicht-spezifischen Bindung an doppelsträngige DNA^{227,315}. Sie kann u.a. durch CK2 in ihren serinreichen, sauren Regionen phosphoryliert werden, was durch die Blockade der Bindung zu TFIIA und anderen Aktivatoren (bemerkenswerterweise auch HIV-1 Tat) zur Inaktivierung von PC4 führt^{227,316,317}. Eine gegensätzliche, aktivierende Modifikation ist die Acetylierung einer lysinreichen Region im N-Terminus durch p300, welche durch die CK2 vermittelte Phosphorylierung unterbunden wird³¹⁸. Der C-Terminus des PC4 kann hingegen an gegenläufige, einzelsträngige DNA binden und so durch Blockade dieser Stränge die basale Transkription bereits vor Assemblierung des PIC inhibieren³¹⁹. Im aktivierten Zustand ist diese Domäne durch Interaktion mit dem N-Terminus abgeschirmt, die beschriebene Phosphorylierung durch CK2 führt jedoch zu einer Konformationsänderung welche den C-Terminus demaskiert und die Inhibition induziert^{315,320}. Ähnlich wie PC1/PARP-1 übt PC4 seine Funktion als Coaktivator durch die Interaktion mit anderen Aktivatoren, Coaktivatoren und der generellen Transkriptionsmaschinerie aus. An dieser Stelle sei nur eine Auswahl der vielfältigen Bindungspartner genannt, so konnte u.a. die Interaktion mit BRCA1³²¹, p53³²², TFIIA²²⁷, TFIIF³²³ oder der RNAP II³²⁴ festgestellt werden. Interessanterweise kann PC4 die enzymatischen Aktivitäten von TFIIF sowie FCP1 gegenüber der CTD modulieren und so auch die Elongation stimulieren³²⁵.

NC1 (auch HMG1 oder HMGB1, *high mobility group box 1*) gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die mit dem Chromatin assoziieren und in der Lage sind, die DNA vorrangig an deformierten Loci zu biegen. NC1 besitzt dafür zwei homologe HMG-Box-Domänen, welche in unspezifischer Weise an die kleine Furche der DNA binden^{326,327}. Es reprimiert die basale Transkription durch Ausbildung eines festen HMGB1-TBP-Komplexes, der eine Inkorporation des TFIIB blockiert³²⁸. TFIIA kann in seiner Funktion als Antirepressor das HMGB1 aus diesem Komplex entfernen und somit die weitere Assemblierung des PIC ermöglichen²²⁷. Auf der Gegenseite ist NC1 auch in der Lage zwecks Aktivierung der Transkription mit Coaktivatoren wie p53, HOX, TBP oder TAF10 zu interagieren³²⁹⁻³³¹.

2.1.7. P-TEFb

2.1.7.1. Allgemeines

P-TEFb ist die Abkürzung für den positiven Transkriptions-Elongationsfaktor b (*positive transcription elongation factor b*, auch TAK für *Tat-associated kinase*). Er ist eine kernständige, Cyclin-abhängige Kinase (CDK), die wie alle CDKs als Heterodimer aus zwei Untereinheiten besteht, hier CDK9 und CyclinT1. Cyclin T1 ist ein 87 kDa Protein, das in ca. 80% aller P-TEFb Komplexe vorkommt³³². Es trägt mehrere funktionelle Domänen zur Bindung des HIV-1 Tat Protein (siehe unten), von BRD4 (AS 426-516) und der RNAP II CTD (AS 506-530)^{333,334}. Die 42 kDa CDK9 Untereinheit beinhaltet eine typische Kinase-Domäne (*kinase fold*) mit einem N-terminalen Flügel (AS 16-108), einem C-terminalen Flügel (109-330) sowie einer T-Schleife (*T loop*, AS 168-197), die ATP- und Substrat-Bindung steuert³³⁵⁻³³⁷. Die Cyclin-Untereinheit steuert die Regulation der CDK durch Konformationsänderung nach Phosphorylierung der T-Schleife des CDK. Im Falle des P-TEFb handelt es sich bei dem Ziel dieser Phosphorylierung um das Thr186 des CDK9^{338,339}. Diese Phosphorylierung wird wahrscheinlich über die CaMK1D (*Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase 1D*) gesteuert, deren Inhibierung in HeLa- und CD4⁺-Zellen zu verringerter Phosphorylierung des Thr186 und Repression der HIV-1 Tat Transaktivierung führt³⁴⁰. Auch die Phosphatasen PPM1A (*protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1A*) und PP2B (*phosphoprotein phosphatase 2B*) vermitteln durch ihre enzymatische Funktion eine Inaktivierung des CDK9 durch Dephosphorylierung der T-Schleife^{341,342}. Diese Repression steht jedoch im Kontrast zu vorherigen Arbeiten, welche Thr186-P als funktionell inaktivierend beschrieben haben (s.o.)³⁴³. Offensichtlich scheint diese Modifikation kontextabhängige Funktionen zu vermitteln, zumal kürzlich Ser175-P als zusätzliche, regulative Modifikation identifiziert wurde³⁴⁴. Eventuell kann die Aufrechterhaltung dieser Phosphorylierung im inhibierten Zustand eine schnelle Reaktivierung des P-TEFb ermöglichen³³⁹. Andere, z.T. multiple, (Auto-)Phosphorylierungen des CDK9 sind vor allem im Kontext der Infektion von HIV-1

beschrieben^{345,346}. Das assoziierte Cyclin ist wie beschrieben vorrangig das Cyclin T1, jedoch wurden auch Cyclin T2a und T2b sowie *in vitro* Cyclin K als potentielle Partner identifiziert^{347,348}. Obwohl Cyclin T1 und damit P-TEFb gewebespezifisch durch Signalkaskaden hochreguliert wird, z.B. während der Aktivierung von T-Zellen, bleibt das allgemeine Niveau des P-TEFb über den Zellzyklus hinweg stabil³⁴⁹, was auf eine konstante funktionelle Verwendung hinweist. Die Formierung des CDK9/Cyclin T1 Dimers ist notwendig für dessen Funktion und hängt von der Prozessierung des CDK9 durch die Chaperone Hsp70 und Hsp90 ab, freies CDK9 wird hingegen schnell degradiert³⁵⁰.

2.1.7.2. Physiologische Funktion und Auftreten

Als Kinase ist die grundlegende enzymatische Funktion des CDK9 die Phosphorylierung von anderen Proteinen. Das am besten beschriebene Ziel der CDK9 ist die CTD der RNAP II, an der es das Ser2 phosphoryliert und damit den Übergang der RNAP II zur produktiven Elongation einleitet³⁵¹. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass mittlerweile zwei weitere Kinasen, CDK12 und CDK13, die gleiche enzymatische Funktion zugeschrieben wird, so dass die Rolle von CDK9 als alleinigen Regulator der CTD Ser2-P anzuzweifeln ist^{352,353}. Darüber hinaus wurde kürzlich beschrieben, dass CDK9 auch Ser5 phosphorylieren kann, allerdings nur im Ausschluss einer gleichzeitigen Phosphorylierung des Ser2³⁵⁴. Weiterhin phosphoryliert CDK9 zwei weitere Faktoren, die eng mit der RNAP II assoziiert sind und deren post-translationale Modifikation zum Voranschreiten der RNAP II führt. Es handelt sich dabei um die hSpt5 Untereinheit des DSIF (*DRB sensitivity inducing factor*) und die NELFe Untereinheit des NELF (*negative elongation factor*)^{30,355-357}. Zusätzlich zu seiner direkten Aktivität gegenüber RNAP II und assoziierten Faktoren reguliert CDK9 auch das Niveau der Histon H2B Monoubiquitinylierung (H2Bub1) sowie das korrekte Ablesen der 3'-Enden der synthetisierten RNA³⁵⁸. Die Kontrolle der H2Bub1-Signatur und damit der Stabilität der Nukleosomen an Promotoren erfolgt über die Aktivierung des UBE2A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2A*) durch Phosphorylierung^{359,360}.

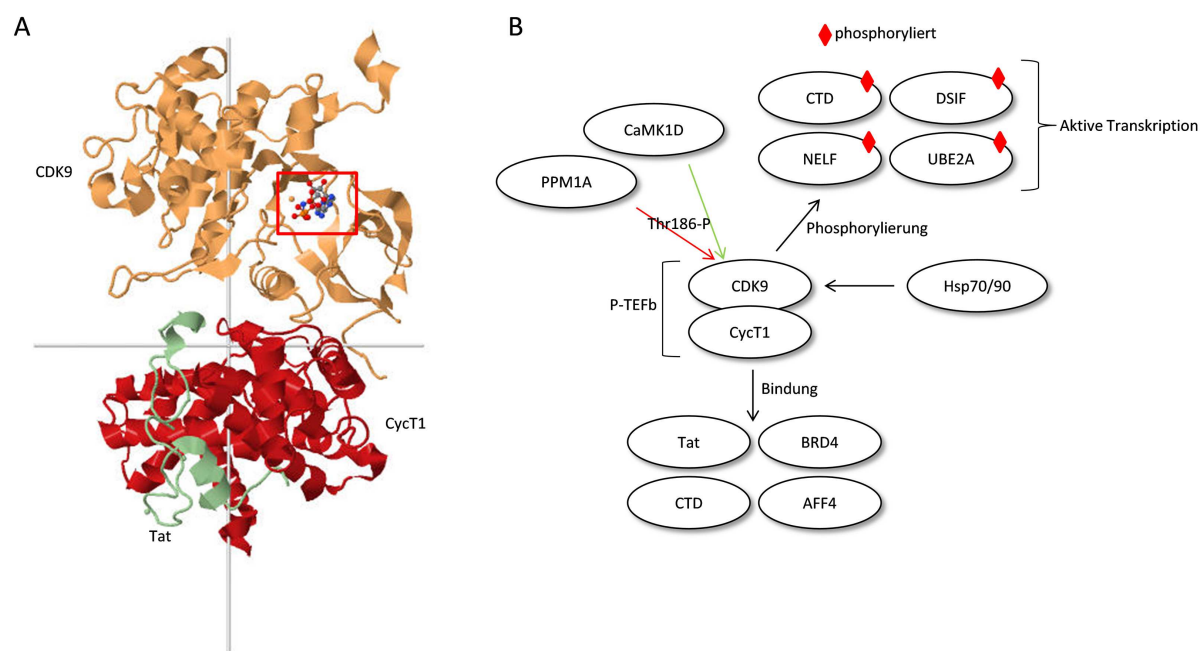


Abbildung 2.1.7.2. Struktur und Funktion des P-TEFb. (A) Darstellung des P-TEFb Heterodimers aus CDK9 (orange) und CyclinT1 (rot) im Komplex mit HIV-1 Tat (grün) und ATP (roter Kasten). Die Abbildung entstammt in modifizierter Form dem Eintrag 3MIA der RCSB Protein Data Base, zur besseren Orientierung sind räumliche Achsen angedeutet. (B) P-TEFb kann nur in seiner heterodimerisierten Form aktiv werden. Die Chaperone Hsp70 und Hsp90 prozessieren CDK9 nach der Translation vor der Dimerisierung mit CyclinT1. Die Bindung an CyclinT1 reguliert den Phosphorylierungsstatus des Thr186 der CDK9 über die Kinase CaMK1D und sorgt für dessen Aktivierung. Die Bindung an Substratproteine (RNAP II CTD) und rekrutierende Faktoren (Tat, BRD4, AFF4) erfolgt über CycT1, die Kinasefunktion der CDK9 sorgt für die Phosphorylierung der CTD, der negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF sowie UBE2A. Die Gesamtheit der vermittelten Phosphorylierungen führt zu einer Aktivierung der Transkription durch die Transition der arretierten RNAP II zur produktiven Elongation.

Es wurde früh festgestellt, dass P-TEFb trotz seiner Funktion gegenüber der RNAP II sowie dem Chromatin nur in einer Subfraktion mit dieser lokalisiert ist und ein Großteil diffus im Nukleoplasma vorkommt³⁶¹. Ausgehend von Beobachtungen aus HeLa-Zellen geht man mittlerweile davon aus, dass mehr als die Hälfte des P-TEFb in inaktiven Ribonukleoproteinkomplexen gespeichert ist und nur bei Bedarf (z.B. als Antwort auf Stresssignale durch UV-Bestrahlung oder Actinomycin D sowie bei HIV-1 Infektion) aktiviert wird. In diesen inaktiven Speicherkomplexen (*large inhibitory complex*) assoziiert P-TEFb reversibel und spezifisch mit einer konservierten, inhibierend wirkenden 332 nt 7SK snRNA sowie HEXIM1 (*hexamethylene bis-acetamide inducible 1*, früher MAQ1)³⁶²⁻³⁶⁵. Die 7SK snRNA bildet zwei Haarnadelstrukturen aus, von denen die 5'-Struktur von HEXIM1 und die 3'-Struktur von Cyclin T1 gebunden wird. Erst nach dieser Bindung kann HEXIM1 seinen inhibierenden Einfluss auf P-TEFb ausüben^{366,367}. Die Speicherkomplexe (7SK snRNPs) werden durch MePCE (*methylphosphate capping enzyme*), LARP7 (*La ribonucleoprotein domain family, member 7*, auch PIP7S), diversen hnRNPs (*heterogeneous ribonuclear*

protein) sowie der RNA-Helikase A komplettiert³⁶⁸. HEXIM1 bindet über eine basische Region (AS 150-177) an die 7SK snRNA und kann nur in deren Anwesenheit über den C-Terminus (AS 181-359) auch an Cyclin T1 binden. In Abwesenheit interagieren zwei saure Regionen (AR1 und AR2, AS 211-249) mit der basischen Region und blockieren so die Interaktion mit Cyclin T1^{364,369}. HEXIM1 kann weiterhin über zwei C-terminale *coiled-coil* Regionen (CR1 und CR2, AS 279-352) homodimerisieren. Aufgrund dieser Tatsache wurde postuliert, dass ein HEXIM1 Homodimer über eine 7SK snRNA zwei P-TEFb Heterodimere bindet^{338,370} und zwar mit stöchiometrisch gleicher Ratio³⁷¹. LARP7 und MePCE sind hingegen feste Bestandteile des 7SK snRNP, welche die Stabilität der RNA regulieren. Weiterhin kann der C-Terminus des LARP7 an das aktive Zentrum von MePCE binden und es inhibieren, so dass die reversible Entfernung der stabilisierenden 5'-Cap der 7SK snRNA nicht möglich ist^{372,373}.

P-TEFb kann durch rekrutierende Faktoren nach der Dissoziation aus dem Speicherkomplex gebunden und zu aktiven Promotoren geleitet werden. Diese Rolle wurde bisher den BET Proteinen Brd2, BrdT und vorrangig BRD4 (*bromodomain containing*) zugeschrieben³⁷⁴. Diese Proteine enthalten jeweils zwei Bromodomänen, welche zur Erkennung von acetylierten Lysinen dienen und eine hochkonservierte C-terminale Domäne, die P-TEFb bindet. Zusätzlich wurde beschrieben, dass die Bromodomänen *in vitro* ebenfalls direkt mit Cyclin T1 interagieren, indem sie dessen acetyliertes Lys390 erkennen^{375,376}. Die Kombination dieser Funktionen des BRD4 macht es zu einem idealen Rekrutierungsfaktor, da es über seine Bromodomänen di- und triacetyliertes Histon H3K9 und H4K16 als Marker für aktiv transkribierende Gene erkennen^{377,378} und somit P-TEFb spezifisch zu diesen leiten kann^{333,379}. Ein Großteil der Gene, welche BRD4 als Zubringer des P-TEFb nutzen, sind Gene der Primärantwort und werden über Signaltransduktion-induzierte Elongation gesteuert³⁸⁰. Der genaue Mechanismus dieser Lösung aus den Speicherkomplexen und der eventuelle Bedarf an Cofaktoren ist bisher jedoch nicht geklärt.

Ebenso wichtig wie die Rekrutierung des P-TEFb zu aktiv transkribierenden Genen ist dessen Rückkehr in die Speicherkomplexe nach Aktivierung der RNAP II um die Einleitung produktiver Elongation an ungewollten Genloci zu unterbinden. HEXIM1 wird durch eine Konformationsänderung der 7SK snRNA nach Verlassen des P-TEFb aus dem 7SK snRNP ebenfalls dissoziiert³⁸¹. Die assoziierten hnRNPs stabilisieren die 7SK snRNA in diesem Zustand und vermeiden eine Degradation^{382,383}. Wie die Sequestrierung des P-TEFb zurück zur 7SK snRNA abläuft ist nicht klar, es ist jedoch denkbar, dass die hnRNPs des 7SK snRNP auf mRNA solcher Gene, deren Transkription abgeschlossen wird, übertragen wird³⁸⁴. Dadurch wird die 7SK snRNA gleichsam dort lokalisiert und kann nach der

2. Einleitung

Dissoziation von den hnRNPs ihre HEXIM1-bindende Konformation erneut annehmen. In der Folge bindet dieses und ist dann in der Lage, P-TEFb zu binden und damit zu inhibieren.

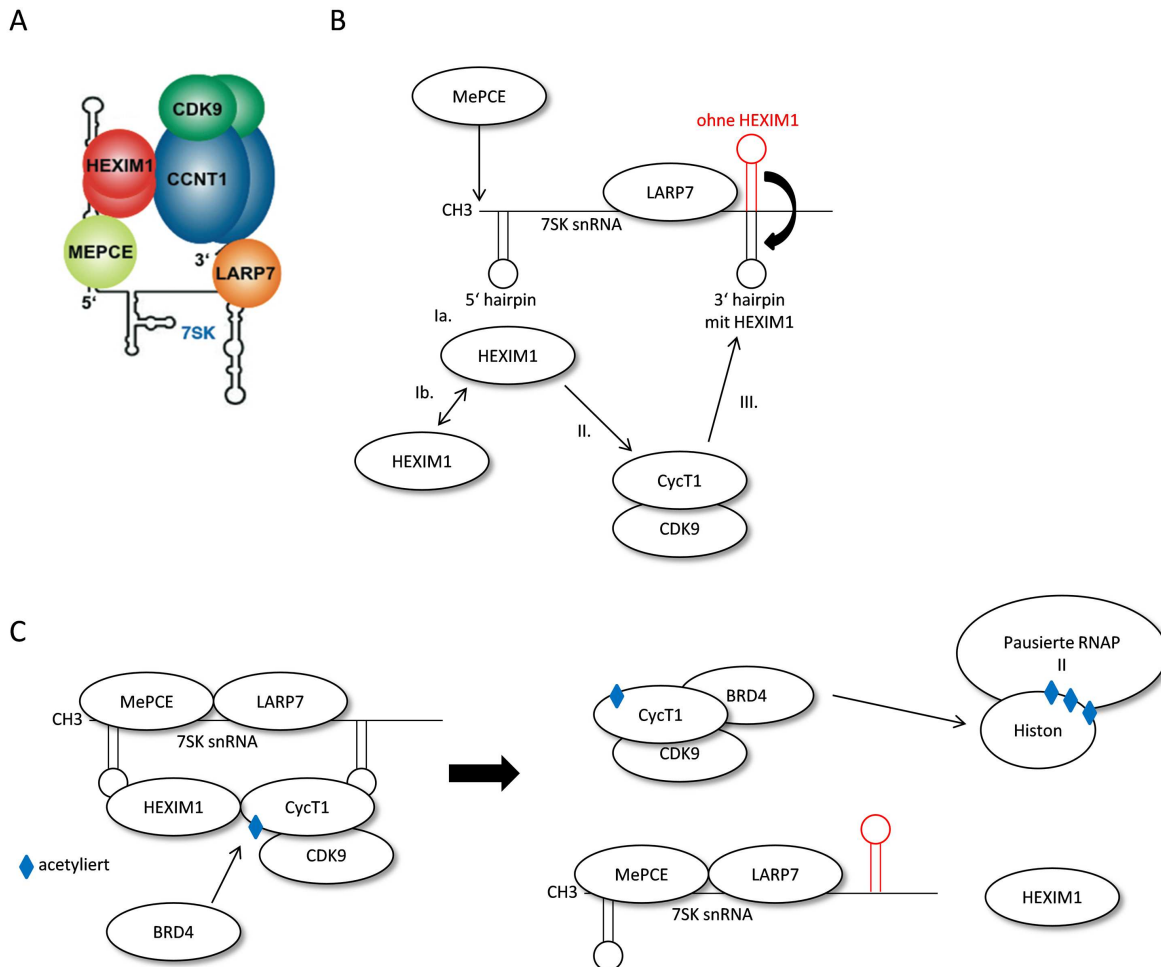


Abbildung 2.1.7.2. P-TEFb Speicherkomplexe und P-TEFb Rekrutierung. (A) Schematische Darstellung der P-TEFb Speicherkomplexe mit der stöchiometrisch korrekten Anordnung von P-TEFb und HEXIM1. (B) P-TEFb wird über HEXIM1 in die Speicherkomplexe inkorporiert. Dazu muss HEXIM1 jedoch zuerst mit der 5' Haarnadelstruktur der 7SK snRNA interagieren (Ia.), was durch Aufhebung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen (Ib.) zu einer Freilegung der C-terminalen Bindungsdomäne für CycT1 führt. Nach der Bindung an CycT1 (II.) bindet dieses wiederum an die 3' Haarnadelstruktur der 7SK snRNA und führt so zur festen Inkorporation des P-TEFb in den Komplex (III.). Die korrekte Konformation der 7SK snRNA liegt nur in Anwesenheit des HEXIM1 vor. (C) Rekrutierende Faktoren wie BRD4 binden an acetyliertes CycT1 und lösen die Speicherkomplexe in der Folge auf. Der exakte Mechanismus ist nicht bekannt, jedoch wird durch die Dissoziation von P-TEFb HEXIM1 in der Folge konformationsbedingt ebenfalls abgetrennt. P-TEFb kann nach dem Herauslösen durch die Bromodomänen-vermittelte Erkennung acetylierter Histone zu aktiven Genloci mit pausierter RNAP II dirigiert werden.

2.1.7.3. P-TEFb als Co-Faktor des HIV-1

Abseits der physiologischen Transkription hat P-TEFb jedoch auch eine entscheidende Rolle auf die Infektion des HIV-1. Es ist bekannt, dass P-TEFb für die Transaktivierung der

Elongation durch das HIV-1 Tat Protein notwendig ist und an dem HIV-1 LTR (*long terminal repeat*) Promotorelement wirkt. Eine Inhibition von CDK9/P-TEFb führte im Umkehrschluss zum Verlust der Transaktivierung durch Tat³⁸⁵⁻³⁸⁷. P-TEFb vermittelt über Cyclin T1 die Interaktion zwischen Tat und der TAR-RNA-Haarnadelstruktur (*transactivation response*) am 5'-Ende viraler Transkripte und erlaubt so der RNAP II das Überwinden dieser Blockade. Zusätzlich kann P-TEFb den mit der RNAP II assoziierten HIV-1 Cofaktor Tat-SF1 (*stimulatory factor 1*) phosphorylieren und somit aktivieren³⁸⁸⁻³⁹⁰. Die Vermittlung der Interaktion kann über das TAR-Element erfolgen, welches durch seine strukturelle Analogie die 7SK snRNA verdrängt und ersetzt^{391,392}. Die Kristallstruktur der P-TEFb-Tat Interaktion zeigte, dass auch CDK9 durch seine T-Schleife (phosphoryliertes Thr186) an dieser Interaktion teilnimmt, der Schwerpunkt jedoch tatsächlich auf der Cyclin T1-Tat Interaktion liegt³⁹³ und einzelne, dafür essentielle Aminosäuren (Gln46, Gln50 und Phe176) seitens des Cyclin T1 identifiziert wurden³⁹⁴. Die Aufklärung dieses Zusammenhangs erklärte auch direkt die Spezifität des HIV-1; nur das humane Cyclin T1 besitzt am C-Terminus seiner Cyclin-Domäne das Cys261, welches für die Interaktion mit Tat essentiell ist^{395,396}. Eine Infektion mit HIV-1 führt zur Stabilisierung oder Wiederaufnahme der Cyclin T1 Expression in Monozyten bzw. differenzierten Makrophagen³⁹⁷; dieser Effekt ist abhängig von NF90 (*nuclear factor 90*), welches Cyclin T1 post-transkriptionell reguliert, und dient dem HIV-1 wahrscheinlich zum Verlassen der latenten Phase seines Replikationszyklus³⁹⁸. Wie essentiell das Vorhandensein genau dieses Cyclin T1 für die virale Transkription ist lässt sich aus der Tatsache ablesen, dass eine Repression der Cyclin T1 Expression durch siRNAs zum proteasomalen Abbau des Tat führte³⁹⁹. Demgegenüber führt eine Überexpression von Cyclin K zu einer Repression der Transkription indem es kompetitiv CDK9 bindet und so dem P-TEFb-Komplex entzieht⁴⁰⁰. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass P-TEFb auch in völliger Abwesenheit von Tat und TAR in der Lage ist, das HIV-1 LTR Promotorelement zu aktivieren. Dazu benötigt P-TEFb den speziellen Transkriptionsfaktor SP1⁴⁰¹.

Die Interaktion zwischen Tat und Cyclin T1 führt zum Verlassen der Kernkompartimente, in denen P-TEFb physiologisch die Transkription aktiviert und zu einer Redistribution im Zytoplasma und Nukleoplasma⁴⁰². Tat konkurriert in diesem Kontext mit HEXIM1 um die Bindung an Cyclin T1 und kann so P-TEFb durch Dissoziation des HEXIM1 aktivieren⁴⁰³. Die Bindungsdomänen des Cyclin T1 für HEXIM1 und Tat sind jedoch nicht identisch⁴⁰⁴. Die Rekrutierung durch Tat bezieht sich nicht nur auf aktives P-TEFb, sondern es rekrutiert wie BRD4 durch seine hochaffine Bindung an Cyclin T1 auch kompetitiv aus den Speicherkomplexen und führt neben der Verdrängung des HEXIM1 zu einer Herabsetzung der Menge an 7SK snRNA und zusätzlich zu einer Änderung in deren Konformation, die ein erneutes Verbinden mit P-TEFb verhindert^{381,392,405}. Auch die Induktion der inaktivierenden

Phosphorylierung des HEXIM1 durch den HMBA-induzierten PI3K/Akt Signalweg führte zur Aktivierung⁴⁰⁶, allerdings scheint dies nur in Abhängigkeit von SP1 zu funktionieren⁴⁰⁷. Umgekehrt führte eine Überexpression von HEXIM1 als auch HEXIM2 zur Repression insbesondere der Tat-unabhängigen aber auch der Tat-abhängigen Transkription⁴⁰⁸. Es kann in Abwesenheit von Tat fest an die 5'-NTR, im Besonderen TAR, binden und rekrutiertes P-TEFb inhibieren. Erst die Anwesenheit von Tat dissoziiert diesen Komplex und erlaubt die Aktivierung⁴⁰⁹. In seiner Rolle als Stabilisator der 7SK snRNA und damit der Speicherkomplexe wirkt auch LARP7 als negativer Regulator der viralen Transkription⁴¹⁰. Betrachtet man die Konkurrenzsituation in der Rekrutierung von P-TEFb ist es nachvollziehbar, dass die Überexpression oder Aktivierung von direkt mit Tat konkurrierenden Faktoren wie etwa die CTD des BRD4 oder Progranulin ebenfalls zur Repression der viralen Transkription führen⁴¹¹⁻⁴¹³.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass Tat die physiologische Zusammensetzung der RNAP II assoziierten Komplexe umschichtet. So kommt es bei der Transkription nach der Synthese der TAR-RNA zur Dissoziation des CDK7 und einer bivalenten Substratspezifität des CDK9 sowohl gegenüber Ser2 als auch Ser5⁴¹⁴. Inwiefern dies ein HIV-spezifischer Mechanismus ist, muss aber aufgrund der Entdeckung, dass CDK9 auch in physiologischen Systemen beide Serine phosphorylieren kann (s.o.)³⁵⁴, diskutiert werden. Weiterhin stimuliert Tat die Phosphorylierung von DSIF und der RNAP II CTD durch CDK9^{357,415} und sorgt für einen entsprechenden epigenetischen Kontext der elongierenden RNAP II, indem es die H3K4- und H3K36-Methylierung induziert⁴¹⁶. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Tat in Kooperation mit AFF4 den P-TEFb-Komplex und ELL2 als Elongationsfaktoren interagieren lässt um so die Elongation der viralen Transkription zu koordinieren⁴¹⁷. Tat scheint in diesem Prozess in zwei distinkten Komplexen zu arbeiten. So wurde es zusammen mit P-TEFb und einer stabilisierten 7SK snRNA ohne HEXIM1 (Tatcom1) und in einem größeren Komplex mit AF4, AFF4, AF9, ENL, ELL sowie PAF1 (Tatcom2) beschrieben⁴¹⁸. Weiterhin phosphoryliert P-TEFb Tat-abhängig das Histon H1 an dessen C-Terminus⁴¹⁹. Wie bereits beschrieben, spielt P-TEFb auch eine Rolle in der Prozessierung der mRNA. Dies gilt auch für die Transkripte des HIV-1, so führt die Tat-stimulierte Phosphorylierung der CTD an Ser5 zur Ausbildung der 5'-Methylcap und der einhergehenden Stabilisierung der Transkripte⁴²⁰.

2.1.7.4. Direkte Regulation von P-TEFb

Die strikte Regulation des P-TEFb geschieht durch mehrere Mechanismen, welche sowohl das Proteinniveau der Untereinheiten als auch die direkte funktionelle Inaktivierung des P-TEFb umfassen. Dabei spielen post-translationale Modifikationen von P-TEFb selbst als

auch dessen assoziierter Faktoren in Form von reversibler Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Acetylierung eine tragende Rolle, die im Folgenden erläutert wird.

CDK9 kann CycT1 *in vitro* selbst phosphorylieren, auch wenn die markierte Aminosäure noch nicht identifiziert ist^{346,388}. Das Thr186 der CDK9 als Ziel von Phosphorylierungen und die konträren Erkenntnisse dazu wurden bereits erläutert (s.o.). Zusätzlich kann CDK9 an Thr29, Ser175, Ser347, Thr362 und Thr363 phosphoryliert werden^{335,339,421}. Die beteiligten Faktoren für diese Modifikationen sind nicht bekannt, für die letzten drei Aminosäuren wurde jedoch zumindest *in vitro* eine Autophosphorylierung des CDK9 beobachtet³³⁵. Im Allgemeinen spielen die Autophosphorylierungen eine wichtige Rolle in der Regulation der CDK9, jedoch sind die bisherigen Erkenntnisse schwer zu interpretieren. Es ist für HIV-1 bekannt, dass die Dissoziation des TFIID beim Übergang zur Elongation die Autophosphorylierung des Ser347 Tat-abhängig induziert, da die XBP Untereinheit des TFIID diesen Prozess unterdrückt^{346,422}. Inwiefern dieser Mechanismus eine allgemeine Gültigkeit für die Transkription hat ist unklar, da Ser347 nicht konserviert ist und somit eine weitere Erklärung für die Wirts-Spezifität des HIV-1 sein könnte. Auch die Rolle der Autophosphorylierung des Thr29 erscheint unklar, insofern dass sie die Kinaseaktivität des CDK9 in einem zellbasierten Assay inhibierte⁴²¹, *in vitro* Studien mit aufgereinigten bekannten Coaktivatoren wie Tax oder auch BRD4 jedoch eine kontraindizierte Verstärkung dieser Phosphorylierung zeigten⁴²³. Ser175-P ist hingegen eine eindeutige Markierung für aktives CDK9 und fördert die Interaktion des P-TEFb mit BRD4, die Regulation dieser Modifikation ist aber nicht bekannt³⁷⁹. Interessanterweise erfolgt eine analoge Ser175-P Modifikation in CDK7, die essentiell für die Phosphorylierung der RNAP II CTD ist^{424,425}.

Sowohl CDK9 als auch HEXIM1 sind das Ziel von Polyubiquitylierungsprozessen. Während Cyclin T1 stabil bleibt, zeigt CDK9 eine Halbwertszeit von ca. 50 Minuten und konnte dementsprechend durch Zugabe von Proteasom-Inhibitoren stabilisiert werden. Die Interaktion mit Komponenten des E3-Ubiquitin-Ligase Komplex SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*) erfolgt jedoch nicht direkt durch CDK9, sondern durch die C-terminale PEST-Sequenz (reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)) im Cyclin T1^{426,427}. Auf der anderen Seite ist die Polyubiquitylierung auch wichtig für die Transaktivierung des HIV-1, sie vermittelt die Assemblierung des ternären Komplex zwischen P-TEFb, Tat und TAR⁴²⁸. Analog dazu führt auch die Polyubiquitylierung des HEXIM1 durch HDM2 (*human double minute-2*) in der basischen Region nicht direkt zu dessen Degradation, sondern potenziert dessen inhibierenden Effekt auf P-TEFb⁴²⁹. Die Erklärung hierfür könnte die Aufhebung der durch die Interaktion zwischen basischer und saurer Domäne vermittelten Inhibition sein.

Acetylierungen gehören zu den post-translationalen Modifikationen, die im Gegensatz zu Phosphorylierungen vorrangig in strukturell organisierten Domänen von Proteinen gefunden werden⁴³⁰. Domänen, welche funktionell RNA binden können, gehören zu dem am meisten acetyliert gefundenen Domänen. In dieser Hinsicht war es wenig überraschend, dass auch P-TEFb das Ziel von Acetylierungen ist. So kann Cyclin T1 an vier C-terminalen Lysinen (Lys380, Lys386, Lys390, Lys404) durch p300 acetyliert werden, was in jedem Fall die Bindung der 7SK snRNA negativ beeinflusst und zur Dissoziation des P-TEFb von HEXIM1 und der 7SK snRNA führt. Acetyliertes Cyclin T1 ist daher nur in aktivem P-TEFb vorhanden und essentiell für dessen volle Aktivität⁴³¹. Dies gilt bemerkenswerterweise nicht für die Tat-abhängige Transkription an der HIV-1 LTR, Tat rekrutiert im Gegensatz nicht-acetyliertes Cyclin T1 aus den Speicherkomplexen⁴⁰⁵. Inwiefern diese Acetylierungen sich im Detail strukturell und auf Bindungsprozesse auswirken bleibt jedoch zu klären. Die Deacetylierung dieser Lysine wird durch SirT1 (*Sirtuin 1*) vermittelt⁴³¹. Interessanterweise ist CDK9 ebenfalls ein Ziel der p300 Histonacetyltransferase, so konnte gezeigt werden, dass präferiert Lys44 und weiterhin Lys48 durch p300 acetyliert und durch HDAC3 (*histon deacetylase 3*) des N-CoR Komplex (*nuclear receptor core-repressor*) als auch durch HDAC1 deacetyliert werden. Eine Mutation dieser Aminosäure (K44R) führte *in vitro* zum Verlust der Phosphorylierung des RNAP II Ser2, was der Acetylierung des Lys44 eine aktivierende Funktion zuschreibt⁴³². Umgekehrt führt die Acetylierung des Lys48 durch GCN5 (*general control of amino-acid synthesis 5*, auch KAT2A für *K(lysine) acetyltransferase 2A*) und PCAF (KAT2B) zu einer verringerten Bindung von ATP-Analoga an das CDK9 und damit zur Inaktivierung des P-TEFb. Durch *in silico* Modellierung konnte gezeigt werden, dass eine Acetylierung des Lys48 die ATP-Bindetasche des CDK9 blockieren könnte. Diese Modifikation führt jedoch nicht zu einer Dissoziation von P-TEFb und HEXIM1/7SK snRNA und scheint ein generalisierter Mechanismus der Regulation der CDKs zu sein, da Lys48 in diesen Enzymen stark konserviert ist⁴³³.

Abseits post-translationaler Modifikationen kann CDK9 sowohl mit Cyclin T1 als auch T2 zusammenwirken³⁴⁷. Zusätzlich vermag CDK9 an Cyclin K zu binden (s.o.), in diesem Kontext entfernt sich die Kinase jedoch von der transkriptionellen Regulation und ist anstatt dessen in der Stress-induzierten DNA-Reparatur während der Replikation sowie der Aufrechterhaltung genomischer Integrität involviert⁴³⁴. CDK9 wurde weiterhin in zwei verschiedenen, jedoch funktionell analogen, Isoformen gefunden, so gibt es zusätzlich zu der zuerst charakterisierten 42 kDa Variante auch eine N-terminal erweiterte 55 kDa Variante, welche zusätzliche 117 AS trägt und aus einem strangaufwärts liegenden, alternativen Promotor stammt⁴³⁵. Da in den Vorarbeiten dieser Arbeit nur das CDK9(42) und Cyclin T1 als Komplexpartner des AF4 identifiziert wurden, wird im weiteren Text nur auf diese Isoformen rückbezogen und die Nomenklatur auf CDK9 und CycT1 gekürzt.

Sowohl CDK9 als auch Cyclin T1 werden auf der Ebene der mRNA durch induzierende Stimuli reguliert. Cyclin T1 wird zwar ubiquitär über einen konstitutiven, komplexen Promotor exprimiert, das Niveau der Expression variiert jedoch stark zwischen verschiedenen Geweben und zeigt vor allem im Blut und lymphoiden Gewebe eine hohe Expression^{436,437}. Die Aktivierung von peripheren Blutzellen und primären CD4⁺ T-Zellen führt zu einem Anstieg des mRNA-Niveaus beider Untereinheiten, die Differentiation von Monozyten in Makrophagen führte hingegen nur zur Induktion der CycT1 mRNA⁴³⁸. Diese Induktion ist notwendig zur Kontrolle der Expression verschiedener Gengruppen während der Differentiation⁴³⁹. Im Kontext dazu wurde gefunden, dass eine Mikro-RNA CycT1 auf der mRNA-Ebene inhibiert, so bindet in Monozyten miR-198 an die 3'-NTR des CycT1 und unterbindet deren Translation. Sobald die Differentiation der Monozyten induziert wird, kommt es zu einer starken Repression der miR-198 und so zur verstärkter Translation des CycT1⁴⁴⁰. Die miR-198 unterdrückt so die Transaktivierung durch das HIV-1 Tat Protein. Kürzlich konnten in ruhenden CD4⁺-Zellen weitere, direkt und indirekt regulativ wirkende Mikro-RNAs identifiziert werden, die das Niveau des Cyclin T1 absenken (miR-27b, miR-29b, miR-223 und miR-150)⁴⁴¹.

2.1.8. Elongationsfaktoren und Elongationskomplexe

Der Übergang zwischen der Initiation und der Elongation ist nicht fließend, sondern wird häufig durch das Auftreten pausierter RNAP II unterbrochen⁴⁴². Nur bei Bedarf kommt es über die Aktivität des P-TEFb zum Übergang zur produktiven Elongation mit den beschriebenen CTD-Modifikationen an der RNAP II. Tatsächlich sind die durch DSIF und NELF pausierten Polymerasen die am häufigsten gefundene Form der RNAP II^{443,444}. Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen sein, dass diese drei Faktoren alleine keine Effekte auf die RNAP II vermitteln, sondern ihre Funktion nur kooperativ ausüben^{146,147}. Nach der Aktivierung der RNAP II kann diese in die produktive Elongation übergehen und transkribiert dann auch lange Gene mit einer relativ stabilen Geschwindigkeit bis zum Terminationssignal⁴⁴⁵. Sie wird dabei von einer Reihe von Elongationsfaktoren begleitet, welche ihre Prozessivität regulieren. Diese Faktoren sind z.T. in Multiproteinkomplexen organisiert und sollen im Folgenden beschrieben werden.

2.1.8.1. TFIIS, TFIIF und ELL

Die RNAP II kann unabhängig von der Elongationskontrolle vor allem zu Beginn der produktiven Elongation erneut während der Gentranskription pausieren. Dies kann *in vitro* als Antwort auf einen Mangel an Nukleosidtriphosphaten oder auf eine physische Blockade der Matrize auftreten. Man spricht hierbei von einem Arrest der RNAP II, insofern dass ein solcher Arrest im Gegensatz zur Pause nicht transient ist und zu einem anormalen Verhalten

der Polymerase führt. Die Polymerase verfolgt den synthetisierten RNA-Strang zurück ("backtracking") und das 3'-Ende des Strangs verlässt dadurch das aktive Zentrum. Dies gilt als Signal für die Polyubiquitylierung der RNAP II und deren schneller Degradation um Transkriptionsartefakte zu vermeiden^{446,447}. Ein solcher Arrest kann durch den nicht-essentiellen TFIIIS (*transcription elongation factor A*, vgl. GTFs) aufgehoben werden. TFIIIS ermöglicht der RNAP II die endonukleolytische Spaltung des RNA-Strangs und damit zur Erzeugung eines neuen 3'-Endes, an dem die Transkription wieder aufgenommen werden kann⁴⁴⁸. Es konnte gezeigt werden, dass so arretierte Polymerasen vor allem früh in der Elongation auftreten und durch verbleibende negative Faktoren verursacht werden^{449,450}. Neben TFIIIS spielt auch TFIIIF eine Rolle in der Elongation. Obwohl es ursprünglich als essentieller Faktor für die Initiation identifiziert wurde, konnte TFIIIF *in vitro* die Elongationsrate der RNAP II erheblich steigern⁴⁵¹ und wurde zusätzlich zu Promotorproximalen Positionen auch weiter strangabwärts bis hin zum Terminationssignal vorgefunden⁴⁵². Es bindet vermutlich direkt an arretierte RNAP II und kann dort konzentrationsabhängig die Verweilzeit im arretierten Zustand verkürzen^{146,453}.

Eine weitere wichtige Gruppe der Elongationsfaktoren sind die Proteine der ELL-Familie (ELL1, ELL2, ELL3, *Eleven-nineteen lysine-rich leukemia protein*), welche die Elongationsrate der RNAP II durch mehrfache Unterdrückung des Pausierens am Matrizenstrang erhöhen⁴⁵⁴. Die Namensgebung der ELL-Familie stammt von ihrer Identifizierung als chromosomale Rekombinationspartner des Leukämie-assoziierten *MLL*-Gens auf Chromosom 11 (*MLL-ELL t(11;19)(q23;p13.1)*)⁴⁵⁵. ELL1 kann an die RNAP II und den Elongationskomplex binden und vermittelt eine Stimulation der Elongation bei gleichzeitiger Suppression der Initiation^{456,457}. Es interagiert mit transaktivierenden Faktoren wie EAF1 und EAF2 (*ELL associated factor*), welche Sequenzhomologien zu AF4 aufzeigen und durch *MLL-ENL* verdrängt werden^{458,459}. ELL vermittelt weiterhin die Inhibierung der p53-vermittelten Transkription und steuert so im Falle der genannten Rekombination erheblich zum onkogenen Potential der Fusionsprodukte bei⁴⁶⁰. ELL ist in mehreren distinkten Elongationskomplexen integriert, auf die später in diesem Kapitel eingegangen wird. In neueren Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass ELL abseits seiner Rolle in der Elongation auch für die Assemblierung des PIC und die Einleitung der Initiation essentiell ist⁴⁶¹.

2.1.8.2. PAF-Komplex

Der PAF-Komplex, oder PAFc (*RNA polymerase II associated factor complex*) ist ein RNAP-assoziiierter Multiproteinkomplex, der kooperativ mit DSIF und fakultativ mit TFIIIS ebenfalls stimulierend auf die Elongation einwirkt⁴⁶²⁻⁴⁶⁴ und zusätzlich notwendige co-transkriptionelle

Histonmodifikationen vermittelt. Er ist zwischen Hefen und höheren Eukaryoten stark konserviert und besteht aus den fünf Untereinheiten PAF1 (*RNA polymerase II associated factor 1*), CTR9, CDC73 (*cell division cycle 73, Parafibromin*), RTF1 und LEO1⁴⁶⁵. PAFc ist notwendig für die Erstellung der H3K4 und H3K79 Methylierungssignaturen⁴⁶⁶ sowie der H2Bub1 Signaturen^{467,468} an transkribierten Genen. PAF1 interagiert dabei direkt mit der SET-Methyltransferase MLL1 und kann diese so zu den HOX-Genen rekrutieren⁴⁶⁹, was im Falle einer chromosomalen Translokation des MLL-Gens zur Leukämieentstehung beiträgt⁴⁷⁰. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, das PAFc selbst von Histonmodifikationen abhängig ist. Die durch CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) erstellte, asymmetrische H3R17 Dimethylierung (H3R17me2a) wird direkt durch PAFc gebunden und ist notwendig für die so vermittelte Transkription⁴⁷¹. Weiterhin wird PAFc über die Interaktion zwischen CDC73 und CPSF eine Rolle in der co-transkriptionellen Reifung der 3'-Enden der prä-mRNA, genauer derer Polyadenylierung, zugeschrieben⁴⁷²⁻⁴⁷⁴. Die Integrität des PAFc ist für das Voranschreiten des Zellzyklus wichtig und PAFc wird im Gegenzug Phasen-spezifisch reguliert. Es reguliert in diesem Kontext die Expression mehrerer Cycline, jedoch nicht die des Cyclin T1⁴⁷⁵.

2.1.8.3. SECs

SEC ist die Abkürzung für Superelongationskomplex (*super elongation complex*) und bezeichnet eine Gruppe von variablen Multiproteinkomplexen, die durch ihre Komposition aus Untereinheiten einen starken Einfluss auf die Transkriptionselongation haben. Ein großer Teil dieser Untereinheiten wurde im Vorfeld bereits vorgestellt. An dieser Stelle soll deren kooperative Funktion im Rahmen der SECs erläutert werden. Die Identifizierung der SECs geht auf Interaktionsstudien zwischen häufigen Translokationspartnern des MLL-Gens zurück⁴⁷⁶. So wurden die Mitglieder der ELL-Familie (ELL1-3), alle Mitglieder der AF4/FMR2-Familie (AF4/AFF1, AF5/AFF4, LAF4/AFF3, FMR2/AFF2), AF9/MLLT3, ENL sowie der P-TEFb als Bestandteile der SECs gefunden. Eine Translokation und die daraus resultierenden Fusionsproteine mit einem dieser Partner und MLL, mit der Ausnahme von P-TEFb, führte jeweils zur Assemblierung eines funktionellen SEC und daraus resultierend zu einer deregulierten Aktivierung der MLL-Zielgene (u.a. *HOXA9* und *HOXA10*) und schlussendlich zur Leukämogenese. Dies geschieht durch Umgehung der Elongationspause und dadurch deregulierter Expression dieser Gene^{476,477}. Der zuerst identifizierte SEC besteht aus AFF1/4, P-TEFb, AF9/ENL sowie ELL1/2/3. Zwei weitere SECs, genannt SEC-L2 und SEC-L3 (*SEC-like*) unterscheiden sich durch die Abwesenheit des ELL1/2/3 und durch AFF2 bzw. AFF3 als zentrale Einheit⁴⁷⁸. SECs sind jedoch nicht spezifisch für MLL-Translokationen, sondern wurden sowohl im Zusammenspiel mit dem Tat Protein in einer HIV-1 Infektion^{417,418} als auch im physiologischen Kontext^{477,479} als funktionell beschrieben. Die pausierten

Polymerasen sind als wichtige Regulationseinheit zur schnellen und synchronen Antwort auf externe Stimuli gedacht⁴⁸⁰⁻⁴⁸² und SECs können diese Polymerasen im physiologischen Kontext kontrolliert in die produktive Elongation überleiten. P-TEFb ist die zentrale Einheit der SECs und kann aus den Speicherkomplexen entweder in jene integriert werden oder in distinkte Komplexe zusammen mit BRD4 assemblieren⁴⁸³. Beide Formen existieren *in vitro* jedoch nebeneinander an Promotoren und können die CTD phosphorylieren⁴⁸⁴. Man geht davon aus, dass BRD4-P-TEFb-Komplexe für die basale Transkription und SECs für die schnelle Aktivierung solcher Gene, die durch eine pausierende Polymerase gekennzeichnet sind, wichtig sind. Ein solcher Sachverhalt konnte am Modell der HIV-1 LTR gezeigt werden^{379,417}. Zusätzlich konnte in einem murinen System embryonaler Stammzellen die relative Unabhängigkeit induzierter Gene von BRD4 nachgewiesen werden⁴⁷⁹. Wenn P-TEFb in einen SEC inkorporiert ist, zeigt es die höchste Aktivität verglichen zu BRD4-P-TEFb Komplexen und zu freiem P-TEFb⁴⁷⁸. Zusätzlich dazu bevorzugt das HIV-1 Tat P-TEFb in Verbindung mit dem SEC und konkurriert mit BRD4 um diesen Faktor. Die Transaktivierung durch Tat erfolgt daher nicht in Anwesenheit der BRD4-P-TEFb Komplexe^{374,379}.

Der genaue Mechanismus der Rekrutierung von SECs ist noch nicht aufgeklärt. In pathogenen Situationen wie der *MLL*-Translokation oder HIV-1 Infektion können die resultierenden, nicht-physiologischen Faktoren für die Rekrutierung der SECs sorgen. So kann Tat den SEC, nicht aber BRD4, rekrutieren und gleichzeitig die proteasomale Degradation seiner Komponenten unterbinden, wodurch die Verweilzeit des SEC am Promotor erhöht wird^{417,418,485}. Auch die Fusionsproteine der chromosomalen Translokationen sorgen für eine Stabilisierung der Komplexe und entsprechend einer länger andauernden Transkription^{476,485,486}. In einem physiologischen Umfeld konnte gezeigt werden, dass die ELL-bindenden Faktoren EAF1 und EAF2 mit dem N-Terminus des MED26 interagieren können und so MED26 als Coaktivator SECs rekrutieren könnte. Studien an den Genen *MYC* und *HSP70* zeigten entsprechend einen Verlust an SECs, wenn MED26 vermindert wurde und der *knock-down* von MED26 in HEK293T Zellen führte zum Verlust der Ser2-P an der RNAP II CTD⁴⁸⁷. Weiterhin konnten Interaktionen zwischen AF9/ENL und dem PAF1c nachgewiesen werden^{418,484}.

Betrachtet man die verschiedenen identifizierten SECs, sind die Gemeinsamkeiten in ihrer Komposition deutlich. Sie enthalten jeweils ein Mitglied der konservierten AFF-Familie (AFF1-4) als zentrale Einheit, welche direkte Interaktionen mit P-TEFb, ENL (*YEATS domain-containing protein 1*, *YEATS1*, *MLLT1*) und AF9 (*ALL1-fused gene from chromosome 9 protein*, *YEATS3*, *MLLT3*) eingehen⁴⁷⁸. Ein bedeutender Unterschied ist, dass nur im primär identifizierten SEC auch ELL und damit die Interaktion zu MED26 gegeben ist⁴⁷⁶. Der funktionelle Unterschied zwischen SEC, SEC-L2 und SEC-L3 ist noch

nicht bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass sie im Genom an distinkten Gengruppen vorliegen, wobei SEC wie erwartet die unmittelbar zu aktivierenden Genen wie *HSP70* und zusätzlich auch *MYC* exklusiv steuert⁴⁷⁸. In diesem Kontext konnte für die durch RNAP II transkribierten snRNA Gene ein weiterer, distinkter Komplex identifiziert werden. Er wurde LEC (*little elongation complex*) getauft und besteht aus ELL1 sowie ICE1 und ICE2 (*interacts with the C terminus ELL subunit 1 and 2*)⁴⁸⁸. Es ist auffällig, dass LEC exakt die Untereinheit verwendet, welche in SEC-L2 und SEC-L3 nicht vorhanden ist. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass für verschiedene Gengruppen auch distinkte, regulative Elongationskomplexe vorliegen. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass diese sich dynamisch zwischen verschiedenen Formen umstrukturieren können. Auch in Hinblick auf die Assoziation vieler Untereinheiten der SECs mit pathogenen Mechanismen ist deren Genspezifität bemerkenswert.

2.1.9. Epigenetische Regulation der Transkription

Die kovalente Modifizierung der DNA und des Chromatins bzw. der Histone dient in der Transkription als eine Markierung von transkriptionell aktiven und inaktiven Bereichen des Genoms. Wie bereits angesprochen unterscheidet man zwischen dem aktiven Euchromatin und dem kondensierten, inaktiven Heterochromatin. Die epigenetischen Modifikationen werden durch eine gut definierte Gruppe von Enzymen reguliert und deren korrekte Interaktion ist entscheidend zur Erstellung und Erhaltung physiologischer Expressionsprofile. Man unterscheidet hier zwischen drei verschiedenen Gruppen von Enzymen; solchen, die in der Lage sind, Modifikationen auszulesen (*reader*), solche die Modifikationen erzeugen (*writer*) und abschließend jene, die Modifikationen wieder entfernen (*eraser*).

Auf der Ebene der DNA erfolgt deren Methylierung bzw. Demethylierung/Hydroxylierung durch DNA-Methyltransferasen (DNMT1,3A,3B, *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase*) bzw. Demethylasen/Hydroxylasen (TET1-3, *tet methylcytosine dioxygenase* sowie GADD45A-C, *growth arrest and DNA-damage-inducible*) vorrangig an Cytosin-Nukleotiden⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹. Grundsätzlich scheint der Methylierungsstatus die Ablesehäufigkeit eines Gens zu regulieren und dieser Status kann durch genomische Prägung an nachfolgende Generationen weitergegeben werden. Vor allem in der Zellreifung können so zelltypspezifische Gene an- und abgeschaltet werden^{492,493}. Solche Methylierungen liegen in adulten Zellen in den CpG-Inseln vor, welche in 5'-Bereichen der Gene lokalisiert sind und eine Hypermethylierung dieser Bereiche ist assoziiert mit transkriptioneller Repression^{494,495}. So wird vor allem in malignen Erkrankungen oft eine Repression von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung und gegensätzlich eine Hypomethylierung von Onkogenen sowie eine generelle Hypomethylierung, welche zu genomischer Instabilität führt, vorgefunden⁴⁹⁶.

Die möglichen epigenetischen Modifikationen an Histonen sind deutlich komplexer⁴⁹⁷ und an dieser Stelle soll aus Gründen der Übersichtlichkeit nur auf Histonmethylierung und Histonacetylierung in der Transkription eingegangen werden, welche vorrangig an den Histonen 3 und 4 stattfinden. Das Ziel dieser Modifikationen sind spezifische Lysine und Arginine an den Histonen^{498,499}. Die Nomenklatur und Schreibweise erfolgt als Abkürzung durch die Nennung des modifizierten Hists, der Aminosäure und der Modifikation, z.B. H3K4me3 als Histon 3, Lysin 4 Trimethylierung. Auch bei den Enzymen setzt sich eine vereinfachte Nomenklatur durch, so werden die Histon-Demthylasen als KDMs (*lysine demethylase*) und die Histon-Acetyltransferasen als KATs (*lysine acetyltransferase*) vereint. Acetylierung und Methylierung sind stets reversibel und durch die Identifikation der Arginin- und Lysin-Demethylasen wurde das Arsenal der modifizierenden Enzyme komplettiert⁵⁰⁰. Solche Histonmodifikationen beeinflussen die Bildung des Euchromatin, Promotoraktivierung, Initiation und Elongation sowie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA⁵⁰¹⁻⁵⁰³. So treten beispielsweise simultan bivalente Histonmodifikationen (H3K4me3, aktivierend und H3K27me3, repressiv, *bivalent chromatin*) an Genen von Stammzellen auf und erlauben eine schnelle Regulation dieser Gene in die gewünschte Richtung während der Differenzierung^{504,505}. Auch in adulten Zellen können so sowohl gewebespezifisch als auch bei pathogenen Ereignissen Gengruppen gezielt reguliert werden, ohne dass eine direkte Umstellung der DNA-Sequenz oder der assoziierten Proteine vorgenommen werden muss^{506,507}. Betrachtet man zusätzlich die Vielzahl an rein funktionell betrachtet redundanten Enzymen wird deutlich, dass ihre spezifischen Expressionsprofile und ihre unterschiedlichen Netzwerke aus Protein-Protein-Interaktionen eine zusätzliche Ebene der Regulation einführen⁵⁰⁸.

Die wichtigsten Enzyme für die Methylierung von Lysinresten an Histonen (*writer*) sind MLL, SUV39H1/2 (*suppressor of variegation 3-9 homolog*, auch *Lysine N-methyltransferase 1A*), NSD1 (*nuclear receptor binding SET domain protein*), EZH1/2 (*enhancer of zeste homolog*, auch KMT6B) sowie DOT1L (*DOT1-like, histone H3 methyltransferase*). Für Argininreste sind die PRMTs (*protein arginine methyltransferase*) zuständig. Der resultierende epigenetische Code folgt einem binären Schema, er kann entweder zu transkriptioneller Aktivierung oder zur Repression führen. Aktives Euchromatin enthält die Modifikationen H3K4me3, H3R17me2, H3K36me2/3, H3K79me2/3, H4R3me2 und H4K20me1/2. Inaktives Heterochromatin enthält H3R2me2, H3K9me2/3, H3K27me2/3 und H4K20me3. Für die H3K9me2/3 Signatur ist bekannt, dass HP1 (*heterochromatin protein 1*) durch seine Chromodomäne an diese bindet und das Chromatin weiter kondensiert. Zusätzlich kann HP1 DNMT3A/B rekrutieren, welche durch *de novo* Methylierungen der DNA ein weiteres repressives Signal setzen⁵⁰⁹. Zur Erkennung solcher Signaturen benötigen die nukleären Proteine (*reader*) spezielle Domänen, so werden H3K4me, H3K9me und H3K27me durch

Chromodomänen gebunden, H3K9me und H4K20me durch Tudordomänen und H3K4me zusätzlich durch WD40-Domänen und PHD-Finger⁵¹⁰.

Im Falle der Acetylierungen werden die entsprechenden Lysine über Enzyme mit einer Bromodomäne erkannt und gebunden. Wichtige Vertreter der KATs sind p300 (*E1A binding protein p300*, KAT3b), CREBBP (*CREB binding protein*, KAT3a) und MOF (KAT8). Umgekehrt erfolgt die Deacetylierung der Histone durch Histondeacetylasen (HDACs und Sirtuine). Euchromatin ist durch eine starke Acetylierung der Histone 3 und 4 gekennzeichnet. Die Signaturen H3K9ac und K3K27ac verhindern eine gleichzeitige Methylierung und damit die Bindung von HP1 und DNMT3A/B. Zusätzlich findet man H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac in aktivem Euchromatin, auch wenn diese nicht direktes Ziel einer Methylierung sind. Vermutlich führt die Einführung einer Acetylgruppe zu einer loseren Packung des Chromatins durch elektrostatische Abstoßung. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass trotz der Vielzahl an HDACs und Sirtuine (SIRTs) nur eine kleine Gruppe identifiziert werden konnte, die wichtige Acetylierungssignaturen an den Histonen entfernen kann. HDAC3 sowie SIRT1, SIRT2 und SIRT6 deacetylieren H3K4ac, H3K9ac und H4K16ac und erlauben damit eine folgende Methylierung bzw. Ausbildung von Heterochromatin⁵¹⁰.

2.2. Das AF4 Protein

Das AF4 Protein ist die zentrale Einheit dieser Arbeit und wird in der Folge ausführlich beschrieben. Voranstehend soll die Nomenklatur geklärt werden. Das humane Protein AF4 (*ALL1-fused gene from chromosome 4 protein*) wird durch das Gen *AFF1* (*AF4/FMR2 family, member 1*) codiert. Das ebenfalls in der Transkription und den SECs involvierte humane AF5/AF5q31 (*ALL1-fused gene from chromosome 5q31 protein*) wird durch das Gen *AFF4* (*AF4/FMR2 family, member 4*) codiert. AF9 (*ALL1-fused gene from chromosome 9 protein*) ist hingegen kein Mitglied der AF4/FMR2 Familie, sondern wird durch das *MLLT3* (*myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3*) codiert und ist stark homolog zu ENL.

Ausgehend von der Nomenklatur wird deutlich, dass diese Gene und deren Proteinprodukte zuerst als funktionell ähnliche, chromosomale Translokationspartner des *MLL* (früher *ALL-1*, *HRX*) identifiziert wurden⁵¹¹⁻⁵¹³. Die Translokation t(4;11)(q21;q23), also zwischen *MLL* und *AFF1*, ist die häufigste Translokation (ca. 40%) in der akuten lymphoblastischen Leukämie (*ALL*, *acute lymphoblastic leukemia*) bei Kleinkindern und ist assoziiert mit einer schlechten Prognose. Sie resultiert in funktionellen, reziproken Fusionsproteinen, genannt MLL-AF4 (der11)⁵¹⁴ und AF4-MLL (der4), wobei die Expression des der4 auf Ebene der mRNA nur in 84% der untersuchten Fälle gezeigt werden konnte⁵¹⁵⁻⁵¹⁷. Diese Tatsache führte zuerst zu

der Annahme, das MLL-AF4 die entscheidende Rolle in der Pathogenese zufällt. Mittlerweile konnte dem AF4-MLL jedoch erhebliches onkogenes Potential zugeschrieben werden^{518,519} und die pathogenen Mechanismen sowie die Wechselwirkung und Abhängigkeit zwischen MLL-AF4 und AF4-MLL sind unklar und werden intensiv diskutiert⁵²⁰⁻⁵²². Zusätzlich kann eine t(4;11)-bedingte AML (*acute myeloblastic leukemia*) nach langer Latenzzeit auch als sekundäre, therapieinduzierte Leukämie auftreten⁵²³. Die Translokation wird dabei durch Behandlung mit Topoisomerase II-Hemmern wie Etoposid hervorgerufen^{524,525}.

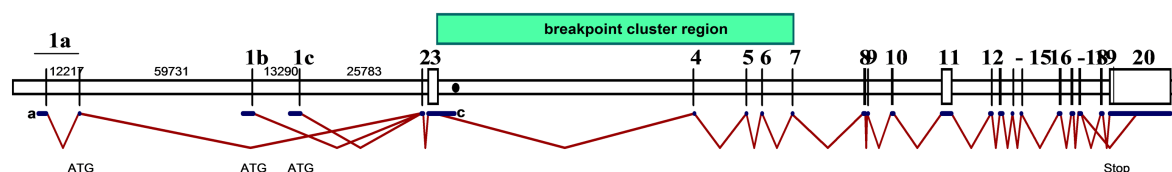
Die ersten Hinweise auf eine Rolle für AF4 in der Transkription kommen von Reporterexperimenten, welche Regionen der Fusionsproteine auf transkriptionelle Aktivierung hin testeten. Dabei konnte einer N-terminalen Sequenz des AF4 (AS 480-560) ein stark aktivierendes Potential zugeschrieben werden, wobei jedoch eine Zelltyp-abhängige Aktivierung zu beobachten war^{526,527}. Gleiches konnte für das kurz darauf identifizierte LAF4 (*Lymphoid nuclear protein related to AF4*), welches durch *AFF3* auf Chromosom 1 codiert wird, gezeigt werden. Hier wurde zusätzlich Kernständigkeit und eine DNA-Bindung des LAF4 gezeigt und damit auch eine Wechselwirkung zwischen Nukleinsäuren und AF4 eingeräumt⁵²⁸. AF4 selbst ist vor allem in der Plazenta stark exprimiert, was seine gedachte Rolle in der *in utero* Entstehung der Translokation und daraus folgend der ALL unterstützt^{529,530}.

Das Gen *AFF1* auf Chromosom 4, Bande 21 besteht aus 20 codierenden Exons sowie 20 Introns, welche eine kodierende Sequenz von insgesamt 9390 Basenpaaren ergeben, wobei ein alternatives erstes Exon 1a und 1b mit jeweils einem funktionellen Startcodon existiert (vgl. Ensembl-Eintrag ENSG00000172493)^{531,532}. In den Exons 3 bis 6 liegen die Bruchpunkte, die im Falle der chromosomalen Translokation entstehen. Weiterhin wurden zwei funktionelle Polyadenylierungssignale entdeckt. Die Nutzung des vorderen Signals in Exon 3 führt zur Translation einer verkürzten Variante des AF4, FelC genannt. AF4 ist ein ubiquitäres Serin- und Prolin-reiches Protein von 1210 Aminosäuren mit den Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors, welches auch in humanen proB-Zellen exprimiert wird. AF4 hat ein Molekulargewicht von 131 kDa, zeigt aber ein apparentes Gewicht von 171 kDa, dessen Auftreten nicht geklärt ist. Zusammen mit den anderen Mitgliedern seiner Familie zeigt AF4 fünf konservierte Domänen, eine N- und C-terminale Homologiedomäne (NHD, CHD), eine Serin-reiche Domäne (pSer, *poly-serine*), zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) sowie die familienspezifische ALF-Domäne. Deren Funktionen sind bisher kaum untersucht. AF4 zeigt eine Lokalisation in vorrangig subnukleären Kompartimenten^{532,533}. Gleiches konnte für das murine Homolog Af4 gezeigt werden. Diese Arbeiten zeigten weiterhin, dass Af4 eine Rolle in der hämatopoetischen/lymphatischen Reifung eine Rolle spielt⁵³⁴ und dass die Expression nach Reifung der Zellen reduziert wird. Dies gilt auch für B-Lymphozyten und verbindet damit

2. Einleitung

die Deregulation des AF4 in der Translokation mit dem Phänotyp einer proB-ALL⁵³⁵. Interessanterweise konnte die transaktivierende Fähigkeit des AF4 (s.o.) nicht in proB-Zellen (REH) nachgewiesen werden⁵²⁷.

A



B

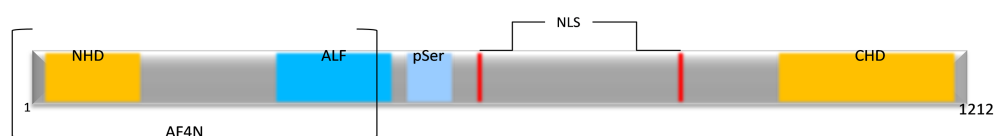


Abbildung 2.2.a. Gen- und Proteinaufbau des humanen AF4. (A) Schematische Genstruktur des *AFF1* Gens auf Chromosom 4, Bande 21. Das alternative erste Exon sowie die *breakpoint cluster region* sind angedeutet. Die chromosomale Translokation t(4;11)(q21;q32) fusioniert die jeweilig flankierenden Teile des Gens nach dem Bruch mit denen des *MLL* Gens auf Chromosom 11, was zur Entstehung der reziproken, chimären Proteine MLL-AF4 (der11) und AF4-MLL (der4) führt. (B) Schematische Darstellung des AF4 Proteins. Die identifizierten Domänen sind markiert (NHD = N-terminal homology domain, gelb; ALF = AF4, LAF4, and FMR2 family domain, dunkelblau; pSer = poly serine region, hellblau; NLS = nuclear localization signal, rot; CHD = C-terminal homology domain, gelb). In Klammern wird der N-Terminus (AF4N) gezeigt, der in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

AF4 kann mit anderen Translokationspartnern wie dem AF9 und ENL direkt interagieren und ko-lokalisiert mit diesen in subnukleären Kompartimenten^{536,537}. Diese Interaktionen sind für leukämische Zellen essentiell und eine Blockade der AF4-AF9 Interaktion führt zu deren Apoptose⁵³⁸. Ebenfalls bekannt war die Interaktion zwischen AF5 (früher MCEF) und P-TEFb, auch wenn diese zu keiner transkriptionellen Aktivierung führte⁵³⁹. Aufgrund solcher Funde wurde die Anwesenheit von funktionellen Multiproteinkomplexen postuliert, konnte jedoch noch nicht direkt bestätigt werden. Weiterhin wurde eine Interaktion mit den E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2 (*Seven in absentia homolog*) gezeigt, welche für die Regulation des AF4-Niveaus zuständig sind⁴⁸⁵. Diese ubiquitinylieren AF4 und führen zu dessen proteasomaler Degradation, welche durch Zugabe von Proteasom-Inhibitoren verhindert werden konnte. In der gleichen Studie konnte zum ersten Mal das Potential zur Wachstumstransformation muriner Zellen nicht nur von AF4 selbst, sondern auch des reziproken Fusionsproteins AF4-MLL gezeigt werden. Die Stabilität des AF4-MLL Komplexes lässt sich nur durch eine kompetitive Situation zwischen Komplexbindeproteinen und dem Ausschluss der SIAH-Proteine erklären, denn es kommt nicht zu einem Verlust der SIAH-

2. Einleitung

Bindungsstellen⁴⁸⁵. Damit wurde dem im AF4-MLL erhaltenen N-Terminus des AF4 erstmalig eine wichtige Rolle in der Leukämogenese zugeschrieben. Gleichzeitig konnten diese Ergebnisse in einem Mausmodell für die sogenannte "*robotic mouse*" bestätigt werden. Diese Mäuse leiden unter dem Verlust an Purkinje-Zellen im zentralen Nervensystem und Ataxie (Störung der Bewegungskoordination). Af4 ist in diesen Mäusen punktmutiert⁵⁴⁰ und kann nicht mehr durch Siah1 und Siah2 gebunden und degradiert werden. Dies führt ebenfalls zur Akkumulation und zu einer stark erhöhten transaktivierenden Funktion des Af4, was die Expression des Igf1 (*insulin growth factor 1*) vermindert und zum Tod der Purkinje-Zellen führt^{541,542}. Die Rolle der SIAH-Proteine wurde kürzlich insofern erweitert, als dass SIAH1 - nicht aber SIAH2 - für die Degradation des stöchiometrisch limitierenden ELL2 zuständig ist und dass die Interaktion von ELL2 mit AF5 im SEC diese Degradation unterbindet. Erst in hohen Konzentrationen konnte SIAH1 AF5 und auch AF4 polyubiquitinylieren und den SEC auflösen⁵⁴³.

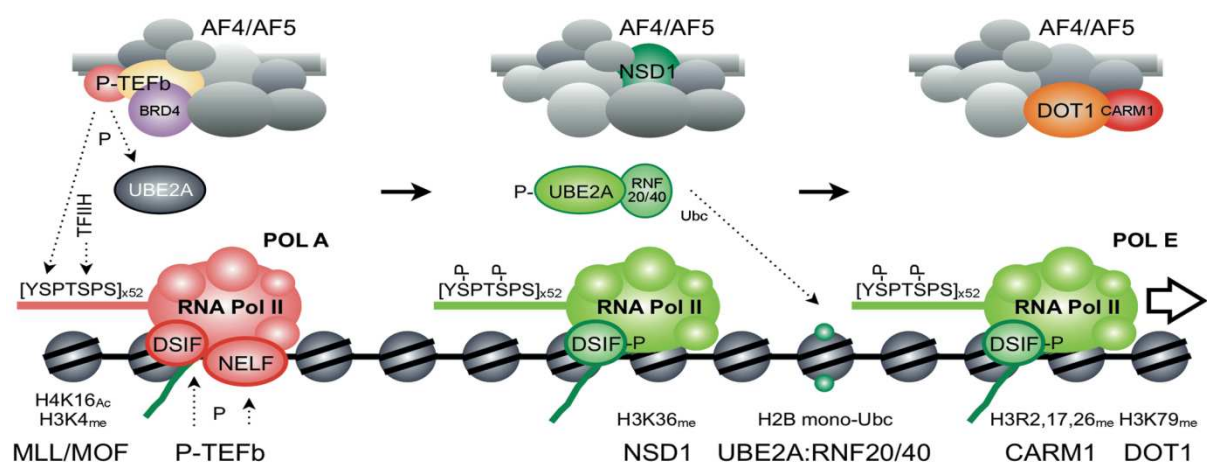


Abbildung 2.2.b. Der AF4 MPC als Aktivator der Transkription. Die Abbildung zeigt schematisch die Effekte des AF4 MPC gegenüber der pausierten RNAP II. Durch Aktivierung des P-TEFb kommt es zur Phosphorylierung von DSIF, NELF sowie des Ser2 der RNAP II CTD und UBE2A. Die RNAP II kann zu ihrer produktiven Form wechseln und wird während der Elongation durch den AF4 MPC begleitet, der durch die assoziierten, histonmodifizierenden Faktoren wie NSD1 (H3K36me), CARM1 (H3R2,17,26me) und DOT1 (H3K79me) Signaturen aktiven Chromatins (Euchromatin) erzeugt. Die Phosphorylierung des UBE2A führt zur Assoziation mit RNF20/40 und der mono-Ubiquitinylierung des H2B. Die Abbildung wurde in modifizierter Form aus der entsprechenden Publikation entnommen⁴⁸⁶.

2007 wurde in einem murinen Modell ein entscheidender Schritt in Hinsicht auf die Aufklärung der Funktion des AF4 gemacht. Af4 interagiert mit Af9, Af10 und Enl und aktiviert den P-TEFb, weiterhin kann es H3K79me3 Signaturen durch die Rekrutierung von Dot1 zur RNAP II vermitteln. Dementsprechend zeigte die "*robotic mouse*" als Modell einer Af4-Überexpression stark hyperphosphorylierte RNAP II sowie übermäßige Histonmethylierung

und damit eine deregulierte, hyperaktive Transkription. In dieser Arbeit wurde Af4 auch als Ziel einer Phosphorylierung durch P-TEFb identifiziert, welche die Aktivierung der Transkription vermindert⁵⁴⁴. Erst drei Jahre später folgte die Identifizierung des ersten analogen, humanen Multiproteinkomplexes, in dem AF4 integriert ist und der am Chromatin der Zielgene des MLL die Transkription aktiviert. Hier wurde die Assoziation mit P-TEFb und ENL sowie eine Heterodimerisierung mit AF5 gezeigt und der resultierende Komplex AEP (AF4/5, ENL, P-TEFb) getauft. Auch MLL-AF4 kann diesen Komplex bilden und so für eine dauerhafte, deregulierte Transkription sorgen⁵⁴⁵. Im gleichen Jahr wurden die Tatcom-Komplexe (siehe Kapitel 2.1.7.2.) gereinigt, welche ebenfalls AF4, AF5 und P-TEFb sowie ELL und AF9 beinhalten und die erste direkte Verbindung zur Elongation der Transkription im Menschen aufzeigten⁴¹⁸. Eine direkte Untersuchung affinitätsaufgereinigter AF4- und AF4-MLL-Komplexe zeigte zusätzlich zu den bereits identifizierten Faktoren Interaktionen mit Chromatin-modifizierenden Enzymen und die Ausbildung von hochmolekularen Multiproteinkomplexen. AF4 interagiert in Co-Immunpräzipitationen mit P-TEFb, BRD4, HEXIM1, NFκB1, NPM1, der RNAP II, NSD1 und CARM1 sowie über seinen C-Terminus mit ENL, AF9, AF10 und DOT1L. AF5 konnte nur in massenspektrometrischen Versuchen gefunden werden. Eine N-terminale Heterodimerisierung mit FelC erfolgte nur mit AF4 und nicht mit AF5. Entsprechend wurden AF5 und auch BRD4 im AF4-MLL-Komplex nicht gefunden, dafür jedoch auch C-terminale Sequenzen des AF4, was auf die Anwesenheit eines über den N-Terminus dimerisierten AF4 im Komplex hinweist. Beide Komplexe waren zudem in der Lage, *in vitro* Histone zu methylieren und P-TEFb zu aktivieren bzw. eine verstärkte Phosphorylierung der CTD zu vermitteln. Überexpression von AF4-MLL führt in diesem Kontext auch zu einem erhöhten globalen Niveau der H3K4me3 und H3K79me3 Signatur, die auf aktive Transkription hinweisen⁴⁸⁶. Eine weitere Studie bestätigte und expandierte diese Ergebnisse, so wurde die Bindungsstelle des CDK9 auf den N-Terminus des AF4 bestimmt und Ser212 und Thr220 des AF4 als Phosphorylierungsstellen identifiziert. Weiterhin wurde der Mediator-Komplex als Interaktionspartner des AF4 bestimmt⁵⁴⁶. Die Heterogenität der Komplexe wurde zusätzlich durch Arbeiten aufgezeigt, die AF4 und AF5 eine Rolle als Gerüst für die Interaktion von P-TEFb und AF9 zuschreiben und P-TEFb als Mediator der Interaktion zwischen AF4 und EAF1/2. Zusätzlich wurde gezeigt, dass DOT1L mit AF9 aber nicht mit AF9-AF4-P-TEFb Komplexen interagiert⁵⁴⁷. Vor allem die Kooperation zwischen EAF1 und AF4 ist interessant, da sie in ihren transaktivierenden Domänen eine begrenzte Homologie aufzeigen und so funktionelle Redundanz möglich ist⁵⁴⁸. Betrachtet man die Gesamtheit der gefundenen Komplexe, wird sowohl AF4 als auch AF5 eine Funktion als Mediator von Interaktionen (*scaffold*) zugeschrieben.

Eine weitere bemerkenswerte Erkenntnis war die Entdeckung der RNA-Bindung durch FMR2, AF5 und LAF4 (AF4 wurde nicht getestet) sowie die unterschiedliche Lokalisation des

AF4 (zusammen mit ENL) im Vergleich zu den anderen Mitgliedern dieser Familie⁵⁴⁹. Vor allem die postulierte Heterodimerisierung mit AF5 ist daher zu hinterfragen. Darüber hinaus zeigten die Fusionsproteine MLL-AF4, MLL-AF5 und MLL-LAF4 einheitlich eine Ras-abhängige Aktivierung des Elk1 Transkriptionsfaktors, was zu deren onkogenen Potential beisteuern könnte⁵⁵⁰. Weiterhin wurde gezeigt, dass AF4 die Transkription des CD133 reguliert und dieser für das Überleben leukämischer Zellen essentiell ist⁵⁵¹. Es gibt zusätzlich eine Assoziation zwischen Polymorphismen des *AFF1/AFF3* und der Kollagenose *Lupus erythematodes*, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

2.3. Herpesviren und Transkription

Viren im Allgemeinen und Herpesviren im Speziellen sind keine eigenständig lebensfähigen Organismen. Obwohl sie ohne eine Wirtszelle für begrenzte Zeiträume überdauern können, ist ihre Replikation obligat an die Infektion eines Wirtes und der folgenden Bemächtigung seiner Replikations- sowie Transkriptions- und Translationsmaschinerie gebunden. Für verschiedene virale Proteine wurde bereits eine enge Assoziation mit dem PIC beschrieben^{552,553}. Es ist daher naheliegend die Frage zu stellen, ob die Proteine humanpathogener Viren auch mit den im Vorfeld beschriebenen Transkriptionskomplexe (SECs) interagieren und diese für die Transkription des viralen Genoms verwenden. Für den HIV-1 ist dies bereits auf beeindruckende Weise demonstriert worden (siehe Kapitel 2.1.7.2.). Über die reinen Effekte einer viralen Erkrankung haben vor allem die Arbeiten von Harald zur Hausen am Humanen Papillomvirus (HPV) eine Assoziation zwischen Krebs und viraler Infektion hergestellt⁵⁵⁴. Betrachtet man die Verwicklung mehrerer Komponenten der SECs mit der Entstehung von Leukämien, darunter vor Allem die ungeklärte Rolle des AF4 in der t(4;11)-assoziierten ALL, so erscheint es sinnvoll zu prüfen, ob sich auch virale Proteine dieser Faktoren annehmen können. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit einbezogenen Herpesviren, das humane Zytomegalievirus und das Epstein-Barr-Virus, kurz vorgestellt und die Rolle der untersuchten *immediate-early*-Proteine des lytischen Zyklus in der Transkription während einer viralen Infektion erläutert werden.

2.3.1. Humanes Zytomegalievirus

2.3.1.1. Allgemeines

Das humane Zytomegalievirus (HCMV, *human cytomegalovirus*) zählt als fünftes Mitglied zu der Gruppe der humanen Herpesviren (HHV-5) und befällt ausschließlich den Menschen. Es ist ein ubiquitäres β -Herpesvirus mit doppelsträngiger DNA (dsDNA-Virus) in einem icosahedralen Capsid⁵⁵⁵. Unter den Herpesviren trägt er das größte Genom von ca. 265 kb mit rund 165 codierenden Genen⁵⁵⁶. Die äußere Hülle wird durch eine Lipid-Doppelschicht

(*envelope*) gebildet, in der mehrere virale Glykoproteine eingebettet sind. Zwischen dieser Doppelschicht und dem Capsid liegt eine Proteinmatrix, die als Tegument bezeichnet wird^{557,558}. Im Tegument ist der Großteil der Proteine des Virions wie z.B. das Matrix-Phosphoprotein pp65/UL83 (*unique long 83*) und der Transaktivator pp71/UL82 lokalisiert⁵⁵⁹. Funktionell betrachtet dienen diese Proteine entweder strukturell der Assemblierung neuer Viruspartikel bzw. der Auflösung des Partikels nach Infektion oder sie beeinflussen die zelluläre Antwort der Wirtszelle auf die Infektion. Eine produktive Infektion führt zu einer dreiphasigen Synthese viraler Proteine, wobei die Nomenklatur der Phasen und der Proteine durch die vergangene Zeit nach der Infektion gegeben ist. So unterscheidet man zwischen der *immediate-early*- (IE, "sofort und frühzeitig", 0-2 Stunden), der *delayed-early*- ("verzögert frühzeitig", <24 Stunden) und der *late*- ("spät", >24 Stunden) Phase/Proteinen⁵⁶⁰.

HCMV kann auf vielfältige Weise übertragen werden, so wurden Speichel, Muttermilch sowie die Plazenta, Bluttransfusionen, Sexualkontakt und die Transplantation sowohl von Organen als auch von hämatopoetischen Stammzellen als Übertragungswege identifiziert⁵⁶¹. Die Prävalenz des HCMV in Blutseren ist dementsprechend hoch, so wurde durch Studien in den USA eine dortige Serumprävalenz zwischen 30 und 90% gefunden, wobei sich eine proportionale Beziehung zum Lebensalter ableiten lässt⁵⁶². Im Falle eines gesunden Immunsystems verläuft die primäre Infektion mit HCMV asymptomatisch. HCMV wird dabei jedoch nicht eliminiert, sondern verbleibt lebenslang in einer Latenzphase, die durch kurze Phasen der Reaktivierung unterbrochen wird. Diese Latenzphase verbringt das Virus vermutlich in undifferenzierten Zellen myeloischen Ursprungs⁵⁶³. In diesen Zellen wird die Aktivierung des MIE-Promotors (*major immediate early*), dessen Genprodukte essentiell für den lytischen Zyklus sind, reprimiert. Im Falle einer Differenzierung kommt es zur Aktivierung des Promotors und zum Einleiten des lytischen Zyklus^{564,565}. Die Permissivität des Virus, also die Fähigkeit zur viralen Replikation, ist jedoch in unterschiedlichsten Zell- und Gewebetypen hoch, so kann das Virus nach primärer Infektion in einer Vielzahl von Organen nachgewiesen werden⁵⁶⁶, darunter auch in Hepatozyten und neuronalen Zellen der Retina^{567,568}. Jedoch wird die effektive Produktion der Viruspartikel zum Großteil in Fibroblasten und auch Epithelzellen gefunden^{569,570}.

Beim Eintritt in den lytischen Zyklus nach Eindringen in die Wirtszelle und Entpackung des viralen Genoms kommt es zur Bindung des pp71 an AP1/ATF-Bindestellen des MIE-Promotor, wodurch die RNAP II rekrutiert werden kann⁵⁷¹. Die transkribierte mRNA der viralen IE-Proteine reift analog zur Wirts-RNA und wird anschließend translatiert. Die resultierenden *immediate-early*-Proteine, IE1 und IE2, können dann ihre essentielle transaktivierende und Chromatin-modifizierende Funktion auf die folgenden Phasen der viralen Genexpression wahrnehmen⁵⁷²⁻⁵⁷⁴. In den weiteren Phasen bilden sich erst die

Faktoren zur Replikation des viralen Genoms (*delayed-early*) und, parallel zur Replikation in der dritten Phase (*late*), die Struktur- und Glykoproteine zur Ausbildung des Capsids und der Ausschleusung aus der Wirtszelle. Die Latenzphase tritt ein, wenn die Immunantwort des Wirtes nach der Primärinfektion eine produktive Replikation unterbindet. Latenz bedeutet an dieser Stelle die Abwesenheit der Bildung von Viruspartikeln, obwohl das virale Genom anwesend ist. Das Virus persistiert dann vor allem in undifferenzierten Zellen myeloischen Ursprungs^{575,576}. Der genaue Mechanismus der Reaktivierung ist nicht bekannt, jedoch scheinen Immunsuppressionen (z.B. nach Transplantationen) als auch die beginnende Differenzierung monozytärer Zellen als Auslöser zu wirken⁵⁷⁷⁻⁵⁷⁹. Vor allem das Zytokin TNF α (*tumor necrosis factor α*) und die Anwesenheit entzündlicher Reaktionen scheinen die Reaktivierung zu begünstigen.

2.3.1.2. IE-Proteine des HCMV

IE1 (UL123) und IE2 (UL122) werden über den MIE-Promotor codiert und gehören zu den ersten translatierten Proteinen nach dessen Aktivierung durch pp71 im lytischen Zyklus⁵⁸⁰. IE1 ist ein kernständiges Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 72 kDa und wird stärker translatiert als IE2⁵⁸¹⁻⁵⁸³. IE2 hingegen kann durch alternatives Spleißen in mehreren Formen auftreten, wobei die Isoform mit 82 kDa (IE82) überwiegt. IE1 und IE2 haben einen identischen N-Terminus mit 85 Aminosäuren, unterscheiden sich jedoch C-terminal durch ein unterschiedliches Exon (UL122/Exon 5 bei IE2 und UL123/Exon 4 bei IE1)^{584,585}. Verkürzte Formen des IE2 (IE55) scheinen autoaktivierende Funktionen zu vermitteln und als Gegenspieler des IE82 zu fungieren⁵⁸⁶.

IE1 und IE2 sind Transaktivatoren sowohl viraler als auch humaner Promotoren. Im Falle ihres viralen Genoms regulieren sie die Expression der folgenden *delayed-early* und *late*-Proteine⁵⁷³, können interessanterweise aber auch die Promotoren anderer Viren aktivieren, darunter auch die des HIV-1⁵⁸⁷. Gemäß ihren strukturellen Unterschieden sind beide jedoch nicht funktionell redundant, sondern zeigen vielmehr kontextabhängig aktivierende und reprimierende Eigenschaften und sind zusätzlich in der Lage, synergistisch zu wirken^{572,588-590}. Im Falle des IE1 lassen sich die aktivierenden Domänen zuordnen, so findet man am N-Terminus eine Leucin- und Prolin-reiche Domäne, welche die *delayed-early*- und *late*-Promotoren aktiviert und so den lytischen Zyklus orchestriert⁵⁹¹. Im C-terminalen Teil befinden sich hingegen ein Leucin-Zipper- als auch eine Zinkfingerdomäne, welche sowohl den eigenen MIE-Promotor als auch Wirtspromotoren transaktivieren^{592,593}. IE1 besitzt darüber hinaus eine intrinsische Aktivität als Kinase, die sowohl zur Autophosphorylierung als auch zur Phosphorylierung von Wirtspoteinen wie den E2Fs in der Lage ist. Die benötigte ATP-Bindestelle befindet sich ebenfalls am C-Terminus des Proteins⁵⁹⁴. Die

transaktivierende Funktion des IE1 erfolgt nicht durch eine direkte Bindung an die DNA, sondern durch die Interaktion und Induktion von Transkriptionsfaktoren wie u.a. TFIID, NFκB und SP1^{590,595,596}.

IE2 besitzt wie beschrieben einen distinkten C-Terminus, der im Gegensatz zu IE1 eine repressive Wirkung ausübt. Ziel dieser Repression ist vorrangig der MIE-Promotor des HCMV^{572,589,597}, allerdings wurde auch eine regulative Funktion gegenüber Wirtspromotoren beschrieben⁵⁹⁸⁻⁶⁰⁰. Auch IE2 kann mit Transkriptionsfaktoren, darunter SP1, TBP und TFIIB interagieren^{590,601,602}, zeigt darüber hinaus aber auch Interaktionen mit Histon-modifizierenden Cofaktoren wie p300 und CREB⁶⁰³ und kann im Gegensatz zu IE1 direkt mit der DNA interagieren^{604,605}.

Die Bindung an Histon-modifizierende Cofaktoren legt nahe, dass die transaktivierende Funktion des IE1 und des IE2 vor allem bei der Reaktivierung auch über eine Umstrukturierung des viralen Chromatins vermittelt wird⁶⁰⁶. Vor allem die Histonacetylierung spielt hier eine wichtige Rolle. IE1 reguliert auf diese Weise am Histon H4 die Expression der *delayed-early* Gene des HCMV und kann die Acetylierung durch eine direkte Interaktion mit HDAC3 regulieren. IE2 zeigt ein breiteres Spektrum an Interaktionen, darunter mit HDAC1/2/3 sowie Histonmethyltransferasen und vermittelt so unter anderem seinen autorepressiven Effekt auf den MIE-Promotor⁶⁰⁷⁻⁶⁰⁹. Grundsätzlich sind HDACs und die IEs des HCMV Antagonisten, so können auf der einen Seite HDAC-Inhibitoren entsprechende Mangelmutanten des HCMV kompensieren und auf der anderen Seite eine ektopische Überexpression von HDAC3 reprimierend auf dem MIE-Promotor wirken^{606,607}. Die exakten Wechselwirkungen zwischen den IEs, Transkriptionsfaktoren und den Histon-modifizierenden Faktoren ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch offensichtlich, dass sich die *immediate-early* Proteine des HCMV umfassend der zellulären Transkriptionsmaschinerie des Wirtes bedienen, um vorrangig den lytischen Zyklus zu initiieren und zu steuern. Inwiefern sie dabei auch auf die zellulären SECs oder Faktoren davon zugreifen, bleibt zu erforschen und könnte sich als ein lohnenswertes Ziel für die Entwicklung von antiviralen Agenzien herausstellen.

2.3.2. Epstein-Barr-Virus

2.3.2.1. Allgemeines

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) zählt wie der HCMV zu den humanen Herpesviren und wird als viertes Mitglied dieser Familie gezählt (HHV-4). EBV ist ein Capsid-tragendes, B-lymphotropes γ-Herpesvirus mit einem dsDNA-Genom von 172 Kilobasenpaaren^{610,611}. Neben einer Reihe von geringfügig modifizierten Subtypen wird grundsätzlich zwischen zwei

Stämmen des EBV unterschieden, welche als Typ 1 und Typ 2 (früher A und B) bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich durch Polymorphismen in den latenten Genen des Virus und in ihrer Verteilung in der Wirtspopulation⁶¹²⁻⁶¹⁴.

Das EBV befällt fast ausschließlich den Menschen, ein Großteil der Weltbevölkerung (~90%) gilt als infiziert. Die Infektion erfolgt in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand des Heimatlandes meist bereits im Kindesalter und befallene Individuen verbleiben nach der primären Infektion lebenslang als Träger des Virus. In gesunden Individuen bleibt die Infektion asymptomatisch⁶¹⁵. Trotzdem ist EBV über die infektiöse Mononukleose (Pfeiffer-Drüsenfieber) hinaus⁶¹⁶ mit einer Vielzahl an relativ seltenen Krebserkrankungen (u.a. Burkitt-Lymphom, Hodgkin-Lymphom, diverse Epithelkarzinome)^{617,618}, einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen (z.B. Rheumatoide Arthritis, *Lupus erythematoses*)⁶¹⁹ sowie der multiplen Sklerose assoziiert⁶²⁰. Die Infektion erfolgt nach jetziger Meinung über den Speichel und damit oral im Bereich der Mandeln, am Oropharynx⁶¹⁵. Dementsprechend sind die primären Ziele des EBV B-Lymphozyten sowie ferner Epithelzellen⁶²¹, wobei zellspezifische Mechanismen in der Erkennung der Wirtszelle und viralen Replikation zur Anwendung kommen⁶²². Die Erkennung der jeweiligen Wirtszelle erfolgt über die Wechselwirkung zwischen viralen Proteinen wie gp350 und BMRF-2 und Membranständigen Proteinen der Wirtszelle wie CD21 bei B-Lymphozyten oder die β -Integrine im Falle der Epithelzellen⁶²³⁻⁶²⁵. Nach der Verschmelzung mit der Zellmembran wird das virale Genom in den Zellkern eingeschleust und dort als episomales Element repliziert.

Der Lebenszyklus des EBV ist analog zu anderen Herpesviren grundsätzlich zweiphasig und besteht aus einer latenten und einer lytischen Phase. Die Infektion eines B-Lymphozyten im Oropharynx führt zu dessen Proliferation und der Präsentation latenter Antigene des EBV. Der folgenden Immunantwort, schlimmstenfalls dem Pfeiffer-Drüsenfieber, können einige infizierte Zellen entgehen, was zu einer Ausdifferenzierung zur Gedächtnis-Zelle führt, in denen das EBV lebenslang in latenter Form persistieren kann^{626,627}. Eine Reaktivierung und Einleitung des lytischen Zyklus erfolgt erst durch die terminale Differenzierung der Gedächtnis-Zelle zur Plasmazelle nach Antigenpräsentation⁶²⁸. In der mehrstufigen latenten Phase erfolgt die Erhaltung und Weitergabe des viralen Genoms durch eine Minimalausstattung viraler Faktoren (oriP, EBNA-1)^{629,630}. Darüber hinaus sorgt eine Gruppe latenter Gene (EBNA-1/2/3, LMP-1/2 sowie mehrere ncRNAs) für die Proliferation und Transformation der Zelle zu einer lymphoblastoiden Zelllinie (LCL). Eine zunehmende und sukzessive CpG-Methylierung des viralen Genoms und dessen Promotoren führt zu einem mehrfachen Promotorwechsel und schränkt das virale Expressionsmuster fortschreitend ein, bis schlussendlich nur EBNA-1 zur Replikation des Genoms verbleibt⁶³¹⁻⁶³³. Dieser Zustand liegt in den infizierten LCL eines gesunden Individuums vor. Eine solche, durch DNA-

Methylierung vermittelte, Repression der viralen Genexpression ist gewollt, insofern als dies der Vermeidung einer Immunreaktion auf die infizierte Zelle dient⁶³⁴. Die Einleitung der lytischen Phase im Lebenszyklus des EBV wird durch die Expression der viralen Transaktivatoren Zta und ferner Rta induziert, welche durch die *immediate early* Gene BZLF1 und BRLF1 codiert sind⁶³⁵. Beide Transaktivatoren sind synergistisch notwendig um die lytische Phase einzuleiten, da sie distinkte virale Gene aktivieren⁶³⁶. Ähnlich zum HCMV kommt es zu einer sequentiellen Genexpression der *early* (E) Gene, welche für die Replikation viraler DNA zuständig sind, und der *late* (L) Gene, welche für die Strukturproteine des Virus codieren⁶³⁷.

2.3.2.2. Zta und Rta

Zta (auch EB1, Z, ZEBRA, *BamHI Z Epstein-Barr replication activator*) und Rta (EB2, R), wurden als obligat synergistische Transaktivatoren identifiziert, welche die *early* Gene des EBV aktivieren können^{638,639}. Welches der beiden Proteine die Induktion der lytischen Phase und die Expression des Anderen tatsächlich initiiert ist jedoch zelltypspezifisch, grundsätzlich zeigt ihre Synergie aber den stärksten induktiven Effekt^{640,641}. Beide Transaktivatoren werden generell nicht in der latenten Phase des Lebenszyklus exprimiert, entstehen aber schnell und nachhaltig nach Induktion der lytischen Phase^{642,643}. Es konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass Zta unmittelbar nach der Infektion für kurze Zeit in B-Lymphozyten exprimiert wird. Es sorgt dort für die initiale Proliferation der naiven Zellen, kann aber aufgrund der fehlenden Methylierung der Promotoren der *early* Gene seine transaktivierende Funktion nicht ausüben⁶⁴⁴. Es ist möglich, dass der Expression der IE-Proteine des EBV eine Aktivierung zellulärer IE-Proteine (EGR-1/2/3) als auch eine funktionelle Rolle kürzlich identifizierter, viraler RNAs vorausgeht, welche eine Expression von Zta und Rta bedingt^{645,646}. Weiterhin gilt für Zta, dass der Plasmazellen-spezifische Transkriptionsfaktor XBP-1s (*X-box binding protein*) an dessen Promotor (PZ) bindet und ihn transaktiviert, wodurch die Induktion der lytischen Phase nach terminaler Differenzierung des B-Lymphozyten nachvollziehbar ist⁶⁴⁷. Grundsätzlich entsteht Zta über eine monocistronische RNA, während sowohl Zta als auch Rta aus einer bicistronischen RNA translatiert werden. Die Regulation dieser Translation ist dabei direkt von beiden Transaktivatoren abhängig⁶⁴⁸. Zta und Rta gelten als die einzigen *immediate early* Faktoren des EBV⁶⁴⁹ und sind primäre Ziele der zytotoxischen Immunantwort durch T-Lymphozyten gegenüber den infizierten Zellen^{650,651}.

Zta wirkt über seinen N-Terminus aktivierend auf die Promotoren der *early* Gene (u.a. BMLF1, BMRF1), gleichzeitig aber auch reprimierend auf Promotoren der latenten Phase^{652,653}. Darüber hinaus ist eine basische Region entscheidend für mehrere Funktionen

des Zta, darunter die Aktivierung von Rta und Regulation der viralen DNA-Replikation. Punktmutationsanalysen ergaben Aminosäure-spezifische Funktionen dieser Domäne⁶⁵⁴. Die aktivierende Funktion des Zta ist dabei z.T. indirekt und benötigt Rta, welches an spezifische Enhancerelemente in den Promotoren bindet oder alternativ über SP1/MCAF1 (*MBD1-containing chromatin-associated factor*) im Falle SP1-vermittelter Transkription⁶⁵⁵⁻⁶⁵⁷. Die transaktivierende, saure Domäne des Rta wurde an dessen C-Terminus identifiziert, sie trägt drei konservierte, hydrophobe Bereiche⁶⁵⁸. Zta und Rta wirken zusätzlich autoregulatorisch auf ihre eigenen Promotoren (PR, PZ), wobei Zta PR durch direkte Bindung aktiviert und PZ ausschließlich in *cis* reguliert und Rta über SP1/3 auf PR wirkt^{659,660}. Die Rta-vermittelte Induktion des Zta geschieht über den Transkriptionsfaktor ATF2 (*activating transcription factor*), der über MAP-Kinasen aktiviert wird⁶⁶¹. Grundsätzlich wirkt ein Zta-Homodimer durch Bindung an AP-1/ZRE Bindungsstellen in *cis* als Transkriptionsfaktor und Rta über Bindung an dessen Enhancerelemente⁶⁶²⁻⁶⁶⁴. Abseits der Regulation der Gene der lytischen Phase beeinflussen sich Zta und Rta auch gegenseitig. So führt eine spezifische Phosphorylierung des Zta zur Repression Rta-vermittelter Transkription von *late* Genen⁶⁶⁵.

Interessanterweise erfolgt die Bindung von Zta vorrangig an methylierte Promotoren und die folgende Transaktivierung ist obligat von 5-Methylcytosinen in den dortigen CpG-Motiven abhängig^{666,667}. Da das virale Genom in der latenten Phase grundsätzlich stark methyliert wird, muss Zta zwangsläufig in der Lage sein, methylierte DNA in verschiedenen Promotoren zu binden^{644,668,669}. Dies erfolgt durch die Aminosäuren Cys189 und das Ser186, welche spezifische Methylcytosine in CpG-Motiven an den gegenläufigen DNA-Strängen kontaktieren und so die Bindung vermitteln⁶⁷⁰. Rta ist zwar grundsätzlich ebenfalls in der Lage methylierte DNA zu binden, kann aber seine transaktivierende Funktion nur an unmethylierten Promotoren mit aktivierenden, acetylierten Histon-Signaturen ausüben⁶⁷¹. Zusätzlich zu der repressiven Methylierung der DNA sind auch die assoziierten Histone entsprechend epigenetisch reprimiert (H3K9me3-, H3K27me3-, H4K20me-Signaturen), werden aber nach Induktion der lytischen Phase analog zur zellulären Epigenetik aktiviert^{672,673}.

Zta ist über seine Rolle in der Transaktivierung der *early* Gene hinaus auch das virale Protein, welches in Kooperation mit BMRF1 die DNA-Replikation des linearisierten viralen Genoms in der lytischen Phase reguliert^{674,675}. Die funktionelle Umstellung des Zta von der Transaktivierung der *early* und *late* Gene zur viralen DNA-Replikation erfolgt durch Phosphorylierung einer Casein Kinase 2 Erkennungsstelle im Zta⁶⁷⁶. Interessanterweise bildet die Erkennungssequenz am lytischen Replikationsursprung des viralen Genoms (OriLyt) wie z.B. das TAR-Element des HIV-1 eine Haarnadelstruktur aus, die spezifisch von Zta erkannt und gebunden wird⁶⁷⁷.

Die Bindung des Zta an AP-1 Sequenzen erfolgt über seine Domänenstruktur, in der die basische Region (s.o.) neben einer α -helicalen Dimerisierungsdomäne liegt. Diese Struktur ist analog zu den Leucin-Zippern der AP-1 bindenden Proteine (c-Jun/c-Fos/GCN4). Das virale Zta gehört damit grundlegend zu der Klasse der bZIP Transkriptionsfaktoren, wobei die bZIP-Domäne des Zta signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Dimerisierungskapazität aufweist⁶⁷⁸⁻⁶⁸⁰. Zusätzlich kann Zta direkt an TFIID und TFIIA binden, einen quartären Zta-TFIID-TFIIA-Promotor Komplex ausbilden und die TFIID-TATA-Box Bindung stabilisieren^{552,681,682}. Weiterhin wurden physische Interaktionen mit p53, p65 des NF κ B und den Retinolsäurerezeptoren RAR α und RXR α beschrieben, welche zur gegenseitigen Repression der Transaktivierung führen⁶⁸³⁻⁶⁸⁵, wobei im Hinblick auf postulierte aktivierende Effekte gegenüber dem Zta die Rolle des p53 nicht vollständig geklärt ist^{686,687}. Die Interaktionen mit p53 und auch p65 werden über eine Ankyrin-ähnliche Region am C-Terminus des Zta vermittelt⁶⁸⁸. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Überexpression von c-myc in LCLs die Expression des Zta durch direkte Interaktion mit der transaktivierenden Domäne vollständig blockierte und umgekehrt Zta die Expression von c-myc unterdrücken kann⁶⁸⁹⁻⁶⁹¹. Auch Rta interagiert mit zellulären Proteinen, so wurde die direkte Interaktion mit Oct-1 (*Octamer-binding transcription factor*), TBP, TFIIIB sowie TAF4 und die resultierende Verstärkung der Transaktivierung beschrieben^{692,693}.

Auf der Gegenseite führt die physische, HAT-Domänen unabhängige Interaktion mit p300, CBP sowie mit CREB selbst zu einer bivalenten, kompetitiven Regulation der Transaktivierung durch Zta und zur Induktion der HAT-Aktivität⁶⁹⁴⁻⁶⁹⁶. Auch Rta interagiert zwecks Autoregulation direkt mit CBP, wodurch die aktivierende Funktion der Histonacetylierung in der lytischen Phase des EBV verdeutlicht wird^{697,698}, auch wenn eine Hyperacetylierung alleine nicht ausreichend für die Reaktivierung des EBV ist⁶⁹⁹. Im Kontext dazu liegt das in Chromatin verpackte, episomale Genom des EBV in der latenten Phase mit HDACs assoziiert vor, welche durch phosphoryliertes MEF2 (*myocyte enhancer binding factor*) rekrutiert werden⁷⁰⁰. Im Falle der Reaktivierung des EBV wird MEF2 dephosphoryliert und rekrutiert HATs zum PZ⁷⁰¹. Gleichsam führt auch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren wie Natriumbutyrat zu einer Aktivierung der lytischen Phase⁶⁷⁶. Es kommt dabei zu einer Aktivierung der PKC δ und damit zur Phosphorylierung des SP1. Dies führt zur Dissoziation der HDACs von SP1 und damit von den viralen Promotoren⁷⁰².

Die ektopische Expression von Zta führte zu einem G0/G1-Wachstumsarrest und Induktion von p53, der CDK-Inhibitoren p21 und p27 sowie der Akkumulation von aktivem, hypophosphoryliertem pRb (*retinoblastoma-associated protein*) und zeigt im Kontrast zu anderen viralen Onkogenen damit antiproliferative Eigenschaften. Dieser Arrest des Zellzyklus als auch die Transaktivierung des Zta-Promotors wird über die direkte Interaktion

des Zta und seines Promotors mit C/EBP α (*CCAAT/enhancer binding protein*) vermittelt⁷⁰³⁻⁷⁰⁵. Rta wurde ebenfalls als pRb-bindender Faktor beschrieben und sorgte für eine Dissoziation des E2F1 von pRb, was die Repression des E2F1 gegenüber Zta aufheben könnte^{691,706}. Andere Studien zeigen konträr eine Repression von pRb und p53 sowie eine Induktion des E2F1 nach dem Wachstumsarrest und deuten auf eine Zelltyp-spezifische Regulation hin⁷⁰⁷.

Zta wird an seinen Serinen phosphoryliert und der Status der Phosphorylierung wird durch die PKC/Proteinkinase A reguliert⁷⁰⁸. Vor allem das Serin 186, welches TPA-abhängig (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) durch PKC phosphoryliert wird, scheint für die Rolle des Zta in der Aufhebung der latenten Phase wichtig zu sein^{666,709,710}. Die Rolle der PKC ist ebenfalls nicht uniform, so wurden auch PKC-unabhängige Reaktivierungsmechanismen des EBV sowie eine Abhängigkeit des Einflusses der PKC von der Promotorstruktur des Zta sowie des Zelltyps identifiziert^{711,712}.

Zu den zahlreichen zellulären Zielgenen des Zta gehören u.a. TGF β , TGF β igh3, und hIL10^{713,714}. In diesem Kontext ist anzumerken, dass TGF β 1 indirekt die Expression von Zta induziert, indem Smad3/Smad4/c-Jun/c-Fos Komplexe kooperativ an Smad4 Bindungsstellen im Promotor des Zta binden^{715,716}. Darüber hinaus inhibiert Zta auf mehrfachem Wege die Signaltransduktion des IFN- γ und kann so einer antiviralen Immunantwort vorbeugen⁷¹⁷. Ebenso reprimiert es die Expression des TNF α /TNF-R1 und umgeht so den Zelltod und inhibiert darüber hinaus IRF-7 (*interferon regulatory factor*), wodurch die Interferon-vermittelte Detektion infizierter Zellen verhindert wird^{718,719}. Ein weiterer Mechanismus zur Vermeidung einer Immunantwort ist die Unterdrückung der MHC-vermittelten Antigenpräsentation. Zta blockiert die Transkription durch CIITA (*class II, major histocompatibility complex, transactivator*) und unterbindet so die Expression der MHC-Gene⁷²⁰. Gleichsam inhibiert Rta mehrere Interferon-regulierende Faktoren und unterdrückt direkt die Expression des Interferon- β ⁷²¹.

3. Ergebnisse

3.1. Vorarbeiten

Der Ausgangspunkt der hier präsentierten Ergebnisse waren die Arbeiten zu Komposition und Funktion des AF4- und AF4/MLL-Multiproteinkomplex (MPC). Diese Arbeiten gaben erste, direkte Hinweise auf die regulierenden (AF4) und ektopen (AF4-MLL) Funktionen auf Transkription und auf epigenetische Modifikationen⁴⁸⁶. An dieser Stelle soll deshalb kurz auf einen Teil der Ergebnisse eingegangen werden.

Durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die affinitätsaufgereinigten AF4- und AF4-MLL MPCs in der Lage sind, ein rekombinant hergestelltes, zweifaches RNAPII CTD-Heptapeptid zu phosphorylieren. Der AF4-MLL MPC zeigte dabei eine deutlich stärkere Phosphorylierung wenn es direkt mit der Kinaseaktivität des AF4 MPCs verglichen wurde. Beide Komplexe konnten diese spezifische Aktivität auch in Anwesenheit des CDK Inhibitors DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) ausüben. Der AF4-MLL MPC enthält deutlich mehr CDK9 verglichen zu dem AF4 MPC. Zudem weisen beide MPCs in dieser Relation an bestimmten Lysinresten acetyliertes CDK9 auf (Abbildung 3.1 A). Weitere Untersuchungen bestätigten, dass der AF4-MLL MPC relativ zur Proteinmenge mehr CDK9 inkorporiert, eine Normierung auf CDK9 zeigte dies deutlich (Abbildung 3.1 B, oben). Während beide MPCs nicht sensitiv gegenüber der Inhibition durch DRB sind (Abbildung 3.1 B, mittig), zeigt der Einsatz des CDK9-spezifischen Inhibitors Flavopiridol eine Inhibition der Phosphorylierungsaktivität des AF4 MPCs, nicht aber des AF4-MLL MPCs. Gleichzeitig führt die Behandlung mit Flavopiridol zu einer verstärkten Acetylierung des CDK9 im AF4 MPC (Abbildung 3.1 B, unten). Einhergehend mit der vermuteten Aktivierung von P-TEFb durch ektopische Expression von AF4 oder AF4-MLL führte dies zu einer ungefähr zweifachen Erhöhung des HEXIM1 Proteins in 293T Zellen (Abbildung 3.1 C). Abschließend wurden Luciferase-abhängige Reporterassays in 293T Zellen durchgeführt, die unter Verwendung eines HIV-1 TAR Haarnadelements vor dem Luciferasegen nur Lumineszenz im Falle einer produktiven Elongation der RNAP II aufzeigen (Abbildung 3.1 D, oben). Diese Versuche wurden ohne Expression des HIV-1 Tat Proteins oder Induktion durch TPA durchgeführt, um die direkten Effekte des AF4 MPC bzw. AF4-MLL MPC aufzuzeigen. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt um die schnelle, SIAH-vermittelte Degradation der Proteine zu blockieren. Es zeigte sich in Abhängigkeit von MG132 eine ungefähr 2-3fache Induktion des Reporters durch AF4, die für AF4-MLL jedoch nicht galt (Abbildung 3.1 D, links). Unter Berücksichtigung der geringen Expression des AF4-MLL Fusionsproteins wurden die Lumineszenzeinheiten in der Folge mit einem quantitativen Western-Blot Experiment

3. Ergebnisse

korreliert. In dieser Korrelation zeigten sich ein 2,5-fach stärkere Induktion des Reporters durch AF4-MLL in Anwesenheit von MG132 (Abbildung 3.1 D, rechts).

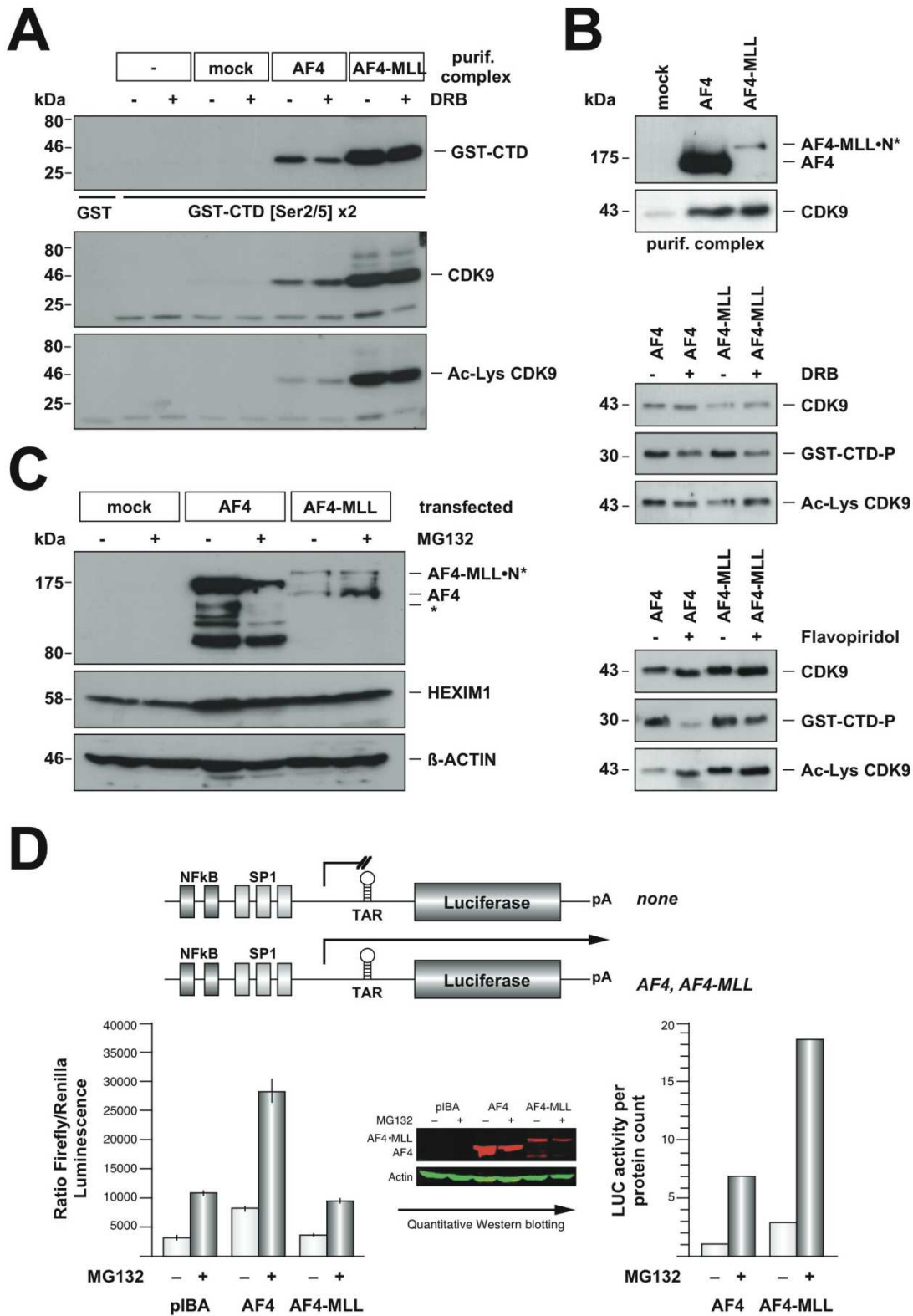


Abbildung 3.1. Vorarbeiten. *In vitro* Phosphorylierungsexperimente mit affinitätsaufgereinigtem AF4 und AF4-MLL Komplexen und einem GST-[YSPTSPS]₂ Substratprotein. (A) Die GST-Kontrolle und das GST-[YSPTSPS]₂ Fusionsprotein wurden mit affinitätsaufgereinigten Proteinen (Kontrolle/AF4/AF4-MLL) aus 293T Zellen inkubiert

3. Ergebnisse

DRB ist ein beschriebener CDK-Inhibitor, der die Phosphorylierung der CTD der RNAP II blockiert. Oben: Detektion des geblotteten GST-[Y(Phos)SPTSPS]₂ Substratproteins durch einen spezifischen Antikörper. Mitte: Menge an CDK9, die in den AF4 und AF4-MLL-MPCs vorhanden ist. Unten: Menge an acetylierten Lysinen in den CDK9 der AF4 und AF4-MLL-MPCs. **(B)** Analoge Experimente, durchgeführt mit auf den CDK9 Gehalt normalisierten MPCs (siehe oberes Bild). Das GST-[YSPTSPS]₂ Fusionsprotein wurde mit den affinitätsaufgereinigten AF4 und AF4-MLL MPCs inkubiert. Die Inhibition des CDK9 wurde durch die Verwendung von DRB und Flavopiridol getestet. Die Menge an CDK9 wurde mit der Kinaseaktivität des P-TEFb sowie dem Grad der Acetylierung des CDK9 verglichen. **(C)** Western-Blot Experimente zur Beobachtung des Niveaus an HEXIM1 in transient transfizierten Zellen. Zellen, die transient mit AF4 oder AF4-MLL transfiziert wurden, zeigen ein erhöhtes Niveau an HEXIM1, was auf eine höhere Kinaseaktivität des P-TEFb hinweist. Die Menge an AF4-MLL Protein was relativ zu AF4 durchgehend niedriger, was darauf hinweist, dass wenige AF4-MLL Moleküle eine funktionelle Äquivalenz zu einem hohen Niveau an AF4 haben. **(D)** HIV-1-TAR-LUC Reporterexperimente. Die HIV-1 Promotor-TAR-Region, welche vor ein Luciferasegen kloniert ist, wurde verwendet, um das Potential von AF4 und AF4-MLL zur Überwindung des TAR-induzierten Arrest der RNAP II strangaufwärts des Gens zu untersuchen. Diese Versuche wurden ohne das Tat Protein oder Stimulation durch TPA durchgeführt, um die direkten Effekte des AF4 und AF4-MLL zu zeigen. Die gemessene Aktivität der Luciferase und die x-fache Induktion nach quantitativem Western-Blotting sind gezeigt. Diese Abbildung entspricht Abbildung 5 aus der zitierten Publikation ⁴⁸⁶.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Anwesenheit von AF4 bzw. AF4-MLL zu einer P-TEFb vermittelten Aktivierung der Transkription führen. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung war jedoch unbekannt, zumal in Hinsicht der Phosphorylierung der CTD als auch der Lysin-Acetylierung des CDK9 die modifizierten Seitenketten aufgrund technischer Beschränkungen der verfügbaren Antikörper nicht exakt bestimmt werden konnten. Weiterhin war unbekannt, ob die aktivierenden Effekte direkt oder mittelbar auf P-TEFb einwirken.

3.2. Produktion stabiler Zelllinien

3.2.1. Induzierbare AF4ST Expressionslinie aus 293T (TCZP-AF4ST)

Um eine reproduzierbare Affinitätsaufreinigung des AF4 MPCs in weiteren Experimenten zu gewährleisten, wurde unter Verwendung des *Sleeping Beauty* Vektor Systems eine stabil transfizierte Zelllinie hergestellt (293T Zellen). Die hier etablierte Zelllinie trägt eine über Doxycyclin induzierbare Expressionskassette der C-terminal Strep-markierten, vollständigen AF4 CDS (AF4ST). Die Wahl fiel auf 293T Zellen, weil dadurch eine direkte Vergleichbarkeit mit den bereits durchgeführten Vorarbeiten gewährleistet wurde.

Der Vorteil der hier etablierten Zelllinie sei kurz erklärt:

- Eine stabile Zelllinie umgeht eine wiederholte transiente Transfektion und ist daher nicht von der Transfektionseffizienz und der Zellpassage abhängig. Die Aufreinigung erfolgt stets aus einer homogenen Zellpopulation.

- Ein induzierbares System führt zu einer deutlich stärkeren Expression des AF4ST und verringert damit die benötigte Mengen an Zellen. Dadurch kann das System bei gleichem Ertrag in einen kleineren Maßstab skaliert werden.
- Die stärkere Expression macht die Verwendung des MG132 unnötig. Damit kommt es nicht zu unspezifischen Akkumulationseffekten anderer proteasomal-regulierter Proteine.

Durch quantitative PCR konnte auf Ebene der mRNA gezeigt werden, dass die Expression des AF4ST durch die konstitutiven Expressionskonstrukte vergleichsweise gering (<100-fach) ausfällt, während das Doxycyclin-induzierte Konstrukt eine ca. 400-fache Anhebung des mRNA Niveaus verursachte. Gleichzeitig ist das induzierbare Konstrukt nicht vollständig abgeschaltet, denn es wird im nicht-induzierten Zustand ein mit den konstitutiven Konstrukten vergleichbares Expressionsniveau erreicht (Abbildung 3.2.1. A). Um die Expression auch auf Proteinebene zu verifizieren wurden Gesamtzelllysate selektionierter und zweimalig passagierter Zellen im Western-Blot auf die Anwesenheit des AF4 untersucht. Dabei wurde auf die Zugabe von MG132 gänzlich verzichtet. Man kann deutlich erkennen, dass nur im Falle einer Doxycyclin-Zugabe am induzierbaren Konstrukt eine detektierbare Proteinmenge entsteht und dieses Konstrukt ohne Induktion - wie auch die konstitutiven Konstrukte - kein detektierbares AF4 produziert (vgl. Spuren TCZP+DOX/TCZP-DOX). Gleichzeitig wurden die Lysate auf die Anwesenheit der Transposase getestet. Diese Experimente zeigten, dass keine Transposase mehr vorhanden war (Abbildung 3.2.1. B, oben). Damit besteht nicht mehr die Gefahr einer Deletion der Expressionskassette durch ungewollte enzymatische Aktivität, denn die Transposase wird normalerweise nach der ersten transienten Transfektion mit jeder weiteren Zellteilung ausgesegregiert.

Um den optimalen Zeitpunkt der Zellernte und Affinitätsaufreinigung des AF4ST zu bestimmen, wurde das Proteinniveau des AF4 in einer Induktionskinetik an mehreren Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 3.2.1. B, unten). Eine maximale Proteinmenge konnte nach 48 Stunden detektiert werden, wodurch die bisherige Methodik der Affinitätsaufreinigung beibehalten werden konnte. Die gebildete Proteinmenge war weiterhin nicht von der Menge des eingesetzten Doxycyclin abhängig (vgl. Spuren 48.1/48.3, entspricht 1 oder 3 µg/ml Doxycyclin). Die Stabilität der Integration wurde regelmäßig am Fluoreszenzmikroskop durch den GFP-Reporter geprüft (Abbildung 3.2.1. C). Dargestellt sind ausgewählte Passagen, in denen auch eine Aufreinigung des AF4ST erfolgreich durchgeführt wurde (max. Passage 37). Insgesamt wurden die Zellen über 50 Passagen in Kultur gehalten und zeigten durchgehend eine homogene Fluoreszenz (nicht gezeigt). Abschließend wurde über ein CCK-8 Experiment eine Wachstumskurve der induzierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten 293T Zellen erstellt, um eventuelle wachstumstransformierende Eigenschaften

3. Ergebnisse

einer AF4ST Überexpression zu untersuchen⁴⁸⁵. Die Proliferation der induzierten TCZP-AF4ST Linie zeigt in den ersten vier Tagen keine signifikanten Unterschiede zu den 293T. Erst nach verlängerter Inkubation von sieben bis zehn Tagen zeigen die induzierten Zellen ein ~1,5-fach stärkeres Wachstum und eine anhaltende metabolische Aktivität trotz Erreichen der Konfluenz (Abbildung 3.2.1. D). Dies sind erste Anzeichen einer malignen Transformation.

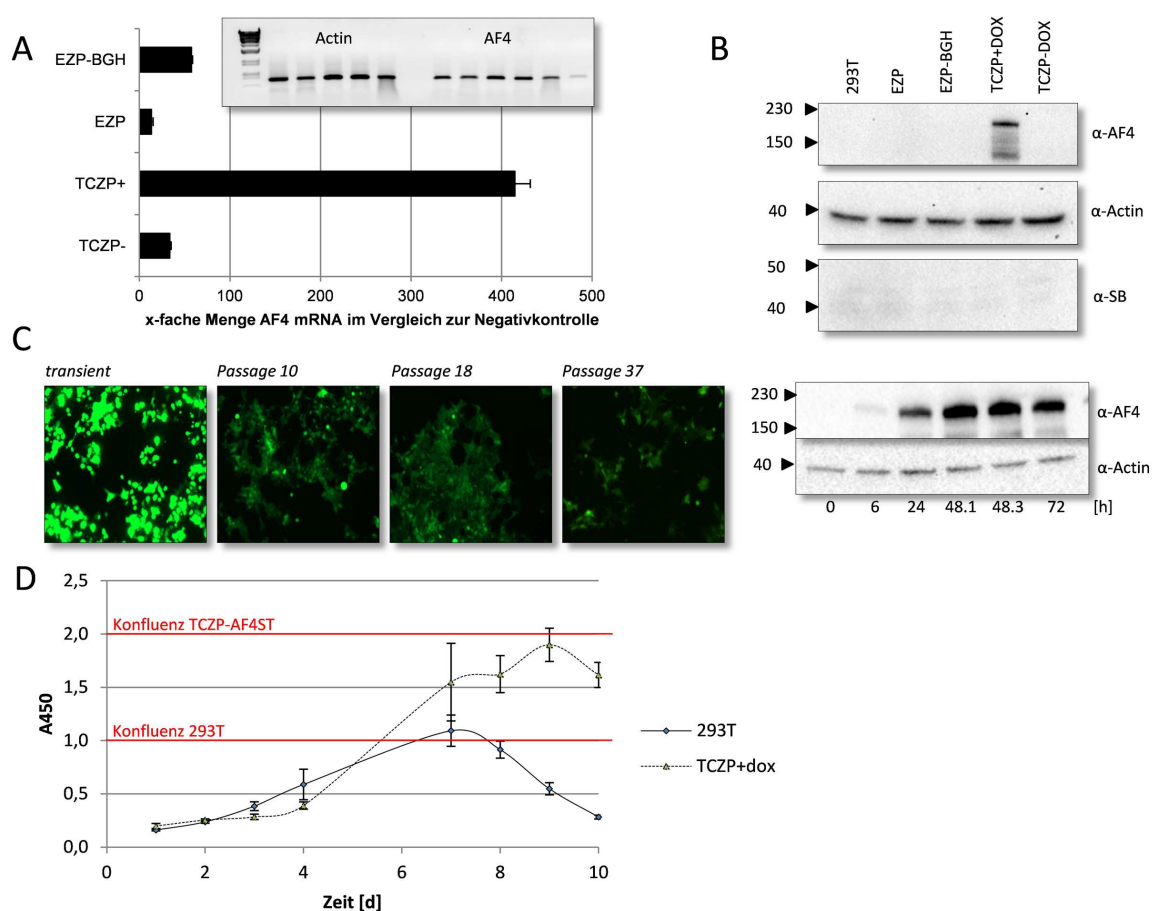


Abbildung 3.2.1. Charakterisierung der TCZP-AF4ST Zelllinie. (A) Großes Bild: Ergebnisse der quantitativen PCR auf die relativen Mengen an AF4 mRNA aus präparierter cDNA beschriebener Zelllinien mit und ohne Induktion durch Doxycyclin verglichen mit unbehandelten 293T Zellen. Die Normalisierung erfolgte auf Actin [n=3, +S.E.M.]. Kleines Bild: Kontrolle singulärer und homogener Amplifikate aus der quantitativen PCR nach 40 Zyklen durch 1,5%-ige Agarose-Gelelektrophorese (B) Oben: Western-Blots aus Gesamtzelllysaten der gezeigten Zelllinien nach 2 Passagen. Die Detektion erfolgte mit den angegebenen, spezifischen Antikörpern. Unten: Western-Blots aus Gesamtzelllysaten der TCZP-AF4ST Linie 0-72 h nach der Induktion durch Doxycyclin. Die Spuren 48.1 und 48.3 unterscheiden sich durch die gegebene Menge an Doxycyclin (.1 = 1µg/ml, .3 = 3µg/ml). (C) *in-vitro* GFP-Fluoreszenzmikroskopie der Zelllinie TCZP-AF4ST in den angezeigten Passagen (100-fach vergrößert, Belichtung 0,5 s). (D) CCK-8 Experimente im Triplikат über 10 Tage, vergleichend zwischen unbehandelten 293T Zellen sowie TCZP-AF4ST Zellen nach Induktion mit Doxycyclin [n=3, +/- S.E.M.].

3.2.2. Stabile AF4 *knock-down* Zelllinie aus HeLa Zellen (AF4kd V100)

Um die Abhängigkeit Transkriptions-assoziiierter Effekte von AF4 zu untersuchen, wurde ein *knock-down* Experiment durchgeführt. Die Generierung eines stabilen *knock-downs* des AF4 Gens erfolgte über das lentivirale "MISSION® shRNA"-System der Firma Sigma-Aldrich mittels einer validierten shRNA gegenüber der AF4 mRNA (Clone ID: NM_005935.1-3282s1c1). Die eingesetzten HeLa Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an Virusüberstand (Mission shRNA::AF4) behandelt (10, 50 und 100 µl, entsprechend V10, V50 und V100), konstant mit Puromycin selektioniert und im Folgenden charakterisiert (AF4kd Zellen).

Da endogenes AF4 Protein in humanen Zellen streng über proteasomalen Abbau reguliert wird ⁴⁸⁵, war ein Nachweis mittels konventionellem Western-Blot oder ein immunhistochemischer Nachweis nicht möglich. Daher wurde der *knock-down* auf der Ebene des Proteins durch einen sensibleren, AF4-spezifischen ELISA überprüft. Proportional zur eingesetzten Menge an Virusüberstand konnte ein signifikanter Verlust an AF4 Protein in den AF4kd Zellen nachgewiesen werden, wobei in der V100 Linie nur noch ~40% des AF4 Proteins relativ zu nicht infizierten HeLa Zellen zu detektieren war. Weiterhin war der Unterschied zwischen V50 und V100 ebenfalls signifikant (Abbildung 3.2.2. A). Da die shRNA nur die Translation der mRNA unterbindet, wurden mittels quantitativer PCR die Niveaus der AF4 mRNA in allen Linien überprüft. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen nicht infizierten HeLa Zellen und den Linien V50 und V100. Im Kontrast zu den Proteinmengen war der *knock-down* in der V50 Linie auf Ebene der mRNA etwas effizienter im Vergleich zur V100 Linie, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.2.2. B). Da schlussendlich das Proteinniveau des AF4 entscheidend für die Interaktion mit den SECs und generell für die Effekte auf die Transkription ist, wurde aufgrund der hier gezeigten Daten im weiteren Verlauf dieser Arbeit die AF4kd V100 Linie verwendet. Analog zu der TCZP-AF4ST Linie wurden vergleichende CCK-8 Experimente zwischen HeLa Zellen und der AF4kd V100 Linie durchgeführt. Es zeigte sich ein deutlich verzögertes Wachstum der *knock-down* Linie. Während die HeLa Zellen bereits nach 6 Tagen Konfluenz aufwiesen, wurde dies von den AF4kd V100 erst nach 8 Tagen erreicht (Abbildung 3.2.2. C). Abschließend wurden die Zellen analog zu Tag 6 der CCK-8 Experimente mikroskopisch dokumentiert, um das verringerte Wachstum und die veränderte Morphologie der AF4kd V100 Zellen darzustellen. So zeigten diese eine "kauernde", abgerundete Morphologie mit deutlichen Freiräumen im Zellrasen im Gegensatz zu den langgestreckten, konfluenten HeLa Zellen (Abbildung 3.2.2. D). Der *knock-down* von AF4 führte damit nachweislich zu einer veränderten Morphologie und zu einer

3. Ergebnisse

Wachstumsretardierung. Allerdings zeigten die Zellen keine Anzeichen von Seneszenz (flache, ausgebreitete Morphologie), wie sie aus HEK293T Zellen bereits bekannt war.

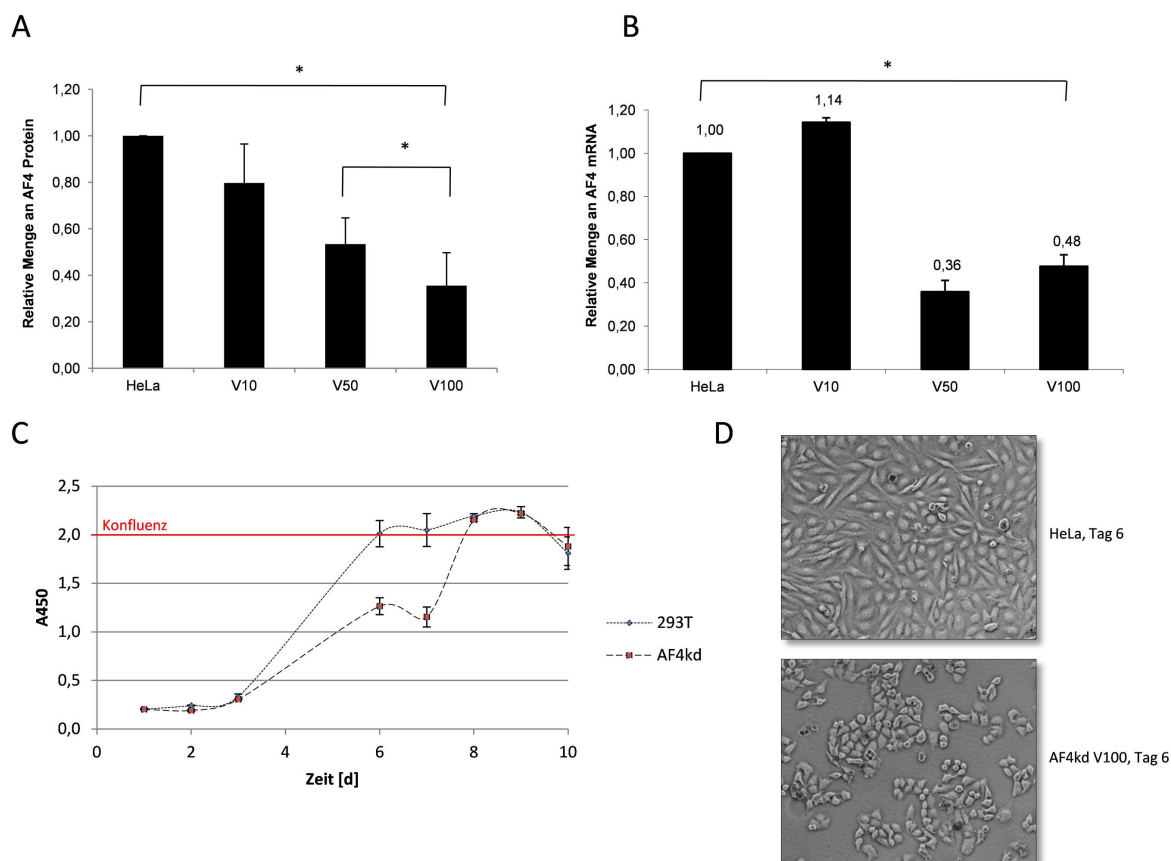


Abbildung 3.2.2. Charakterisierung der AF4kd V100 Zelllinie. (A) Resultate des AF4-spezifischen ELISA. Dargestellt sind die relativen Mengen an AF4 Protein in Gesamtzelllysaten aus den *knock-down* Linien V10, V50 und V100 relativ zu den Mengen in nicht infizierten HeLa Zellen (100% = 1) [n=4, +S.E.M., *=p<0,05]. (B) Ergebnisse der quantitativen PCR auf die relativen Mengen an AF4 mRNA aus cDNA beschriebener Zelllinien verglichen mit nicht infizierten HeLa Zellen. Die Normalisierung erfolgte auf Actin [n=3, +S.E.M., *=p<0,05]. (C) CCK-8 Experimente im Triplikate über 10 Tage, vergleichend zwischen nicht infizierten HeLa Zellen und AF4kd V100 Zellen [n=3, +/-S.E.M.]. (D) *in vitro* Lichtmikroskopie von nicht infizierten HeLa Zellen und AF4kd V100 Zellen analog zu Tag 6 der CCK-8 Experimente (100-fach vergrößert, Belichtung 10 ms).

3.3. Interaktion und Einfluss auf Transkriptionsfaktoren

Während die Interaktion des AF4 mit Komponenten der SECs und P-TEFb bereits beschrieben war, gibt es derzeit keine fundierten Informationen über die Abhängigkeit dieser Transkriptions-assoziiierter Faktoren von AF4 bzw. über die genauen Bindungsdomänen für solche Interaktionspartner. In einer Erweiterung der Charakterisierung der AF4kd V100 Linie wurden daher Gesamtzelllysate von nicht infizierten HeLa Zellen sowie *knock-down* Zellen im Western-Blot auf die Anwesenheit und Unterschiede einer Reihe Transkriptions-assoziiierter Proteine untersucht. Dabei handelte es sich um CDK9 und CycT1 des P-TEFb sowie die aktivierende, post-translationale Modifikation CDK9 T186-P, weiterhin um NFκB1 (p65/p50), CDK2, CDK7 des TFIIH, Menin und AF4 selbst (Abbildung 3.3. A). Es wurden in diesem Versuch Gesamtzelllysate aus einheitlicher Zellzahl/Lysatvolumen und nicht einheitlicher Proteinkonzentration aufgetragen, um Verfälschungen durch transkriptionell repressive Effekte aufgrund des AF4 *knock-downs* zu vermeiden. Aus diesem Grund ist das Niveau an Actin als Ladekontrolle nicht gleich und muss mit dem beschriebenen Korrekturfaktor 0,78 abgeglichen werden. Der AF4 *knock-down* führte demnach vorrangig zu einem deutlichen Verlust der CDK9 T186-P Modifikation (RQ=0,42) und damit zur Inaktivierung des P-TEFb Subkomplexes. Das Proteinniveau von CDK9 (RQ=0,78) bleibt stabil, CycT1 (RQ=0,63) sowie CDK2 (RQ=0,58) sinken leicht. CDK7 (RQ=1,39), Menin (RQ=2,06) und p65 (RQ=1,09) sowie p50 (RQ=1,08) steigen hingegen an. Es wird deutlich, dass ein *knock-down* des AF4 Gens einen Einfluss auf die Proteinexpression dieser Faktoren ausübt und eine Störung des Gleichgewichtes zu sehr spezifischen Korrekturmaßnahmen in der Zelle führt.

In der Folge wurde unter Berücksichtigung der eben genannten Proteine eine Affinitätsaufreinigung des AF4ST MPC sowie seines t(4;11)-assoziierten N-Terminus AF4NST durchgeführt und die normierten Säulen-Eluate mittels Western-Blot untersucht. Diese Untersuchung zeigte, dass CDK7, Menin und p50 ausschließlich Bestandteile des AF4NST-Komplexes und nicht des AF4ST MPC sind. Zudem zeigte dieses Experiment, dass die generelle Bindung an assoziierte Faktoren bei vergleichbarer Menge an AF4 und AF4N wesentlich stärker durch AF4N erfolgte (Abbildung 3.3. B). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CDK2 in keinem der Komplexe vorliegt und somit sich die regulative Funktion des AF4 nicht nur auf direkt interagierende Proteine erstreckt. Da alle hier gezeigten Bindungen des AF4ST MPC auch durch AF4NST vermittelt werden könnten, liegt die Vermutung nahe, dass der N-Terminus des AF4 Proteins die zentrale Schaltstelle für alle genannten Protein-Protein-Interaktionen darstellt. Um dies zu überprüfen, wurden überexprimiertes AF4ST und AF4NST durch einen spezifischen Antikörper, dessen Epitop im N-Terminus des AF4 liegt, immunpräzipitiert und auf die oben genannten Proteine im Western-Blot untersucht

(Abbildung 3.3. C). Beide Proteine konnten durch den Antikörper präzipitiert werden (vgl. Spur α -AF4), aber es konnte - trotz identischer Methode - in den Eluaten keines der Proteine mehr detektiert werden. Einzige Ausnahme war ein schwaches Signal für CDK9. Das sichtbare Signal in der Spur α -NF κ B1(p65/p50) stammt aus einer schwachen Kreuzreaktion mit der schweren Kette des verwendeten Antikörpers.

Um eine mögliche Kompetition zwischen AF4 und AF4N in der Bindung des P-TEFb zu untersuchen, wurde ein N-terminal BFP-markiertes CycT1 zusammen mit einer Leervektorkontrolle, AF4, AF4N oder beiden Konstrukten transient in 293T Zellen transfiziert und CycT1 mittels eines spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert (Abbildung 3.3 D). So konnten sowohl endogenes CycT1 (schwarzer Pfeil, ~80 kDa) als auch BFP-markiertes CycT1 (blauer Pfeil, ~110 kDa) präzipitiert werden (Abbildung 3.3. D, oben). Sowohl AF4 als auch AF4N werden co-immunpräzipitiert, in Anwesenheit beider Proteine werden diese jeweils in der Eluat-Fraktion detektiert, es kommt jedoch zu einer schwächeren Bindung an AF4N sowie einer etwas stärkeren Bindung an AF4 (Abbildung 3.3. D, Mitte). Durch *in vitro* BFP-Fluoreszenzmikroskopie wurde die Expression und Lokalisation des BFP-CycT1 im Zellkern bestätigt. Interessanterweise zeigt das BFP-CycT1 in den Co-Transfektionen mit AF4 und AF4N eine stärker fokussierte, eher punktförmige Lokalisation im Zellkern sowie eine erhöhte Fluoreszenz (Abbildung 3.3. D, unten). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass (1) das AF4 Protein in einem sensiblen Gleichgewicht mit seinen assoziierten Faktoren steht und (2) der N-Terminus des AF4 Proteins ein zentraler Hub zur Interaktion mit anderen Proteinen darstellt. Trotz der unterschiedlichen Bindungsaffinität beider AF4 Varianten konnte für beide gezeigt werden, dass es zu einer AF4N-vermittelten Relokalisation des P-TEFb Komplexes im Zellkern kommt.

3. Ergebnisse

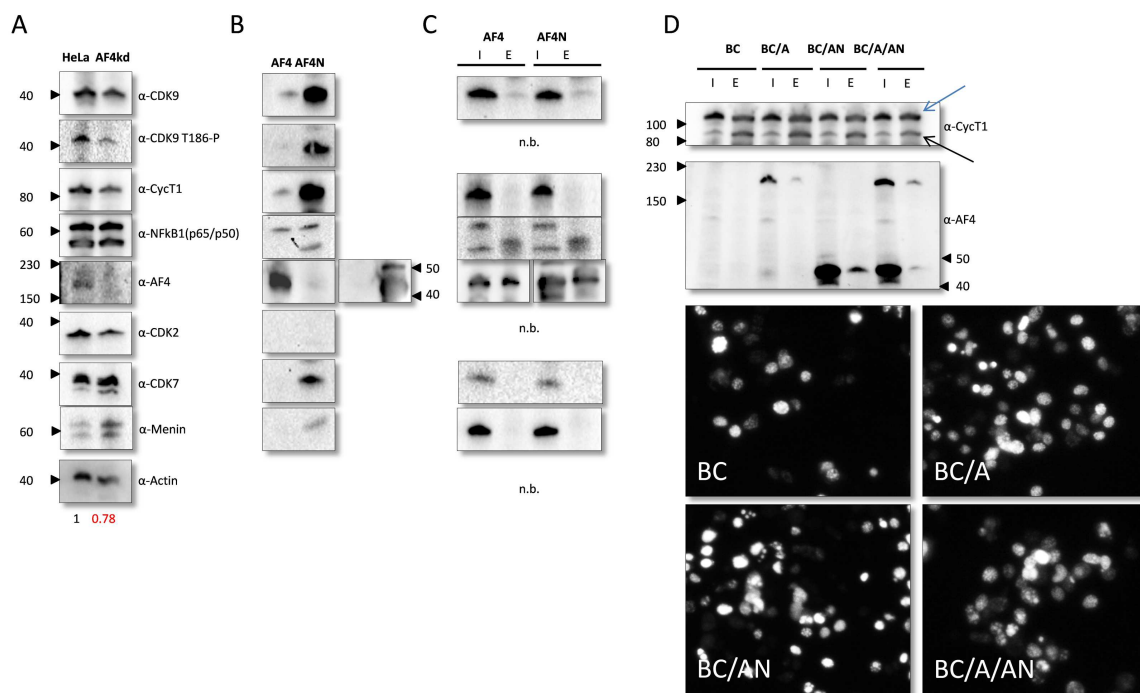


Abbildung 3.3. Interaktion und Einfluss von AF4 auf Transkriptionsfaktoren. (A) Western-Blot Analyse ausgewählter, Transkriptions-assoziiierter Proteine aus Zellzahl-normierten Gesamtzelllysaten von HeLa (links) und AF4kd V100 Zellen (rechts) mittels der beschriebenen, spezifischen Antikörper. Die relative Quantifizierung wurde *in silico* mittels Image Lab 3.0 (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt, wobei die HeLa Zellen als 100%=1 gewichtet wurden. Die dargestellten Größenmarker sind für die gesamte Abbildung gültig. (B) Western-Blot Analyse aus normierten Eluaten der Affinitätsaufreinigung von AF4ST (links) und AF4NST (rechts) mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern analog zu (A). (C) Western-Blot Analyse der Immunpräzipitationen von AF4ST sowie AF4NST analog zu (A) und (B). Links dargestellt ist ein Aliquot (0,2%) des eingesetzten Gesamtzelllysats, rechts ein Aliquot der Eluat-Fraktion (33%). Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegenüber einem Epitop im N-Terminus des AF4 [n.b.=nicht bestimmt]. (D) Oben und Mitte: Western-Blot Analyse einer Co-Immunpräzipitation aus normierten Kernextrakten von 293T Zellen mittels eines CycT1-spezifischen Antikörpers 48 h nach transienter Transfektion von BFP-CycT1 (BC) und einem Leervektor, AF4ST (A), AF4NST (AN) oder beider Konstrukte (A/AN). Dargestellt ist abwechselnd ein Aliquot der Kernextrakte (I, 2%) und ein Aliquot der Eluatfraktion (E, 33%). Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern. Unten: *in vitro* BFP-Fluoreszenzmikroskopie der oben beschriebenen Zellen unmittelbar vor der Zellernte (100-fach vergrößert, repräsentativer Bildausschnitt, Belichtung 0,2 s. Alle Bilder uniform nachbearbeitet durch einen blau-spezifischen Schwarz/Weiß-Filter sowie durch 50%-ige Erhöhung von Belichtung und Kontrast).

3.4. Regulation der P-TEFb Acetylierung durch AF4/AF4N

In den Vorarbeiten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CDK9 in Anwesenheit des AF4 und des AF4-MLL MPCs eine Acetylierung erfährt. Da diese Acetylierung mit einer erhöhten Aktivität der P-TEFb Kinasefunktion einhergeht, lag es nahe, den Acetylierungsstatus der regulativ eingreifenden Aminosäuren Lys44 (aktivierend) sowie Lys48 und Lys49 (deaktivierend) zu überprüfen^{432,433} (Abbildung 3.4. A). Dazu wurden durch zielgerichtete Mutagenese Punktmutationen in einem Flag-markierten CDK9 Expressionskonstrukt hergestellt. In allen Fällen wurden die entsprechenden Lysin-Reste entweder durch Alanin bzw. Arginin ausgetauscht. Von den Arginin-Mutanten (K44R/K4R, K4849R/K8R) wurde erwartet, dass die Aufrechterhaltung der positiven Ladung in der Seitenkette die kritische ATP-Bindung nicht beeinflusst werden sollte; somit sollte die Kinaseaktivität nur durch eine eventuelle Acetylierung beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu dienten die Alanin-Mutanten (K44A/K4A, K4849A/K8A) als *loss-of-function* Mutanten, die in der Zelle keine Kinasefunktion mehr zeigen sollten. Alle Mutanten - sowie ein nicht-mutiertes CDK9 als Kontrolle (C) - wurden in einer transienten Transfektion exprimiert. Dabei zeigten alle eine homogene Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern (Abbildung 3.4 B). Die Co-Immunpräzipitation des Flag-markierten CDK9 mit der potentiell inaktiven K44A Mutante zeigte eine Abhängigkeit des Acetylierungsstatus von der Anwesenheit von AF4. Während CDK9 ohne AF4 nur ein sehr schwaches Signal lieferte (Abbildung 3.4. C, unten), führte die Co-Transfektion von AF4 zu einer deutlich stärkeren Lysin-Acetylierung (Abbildung 3.4. C, oben). Dies konnte bei Verwendung der K44A Mutante nicht gezeigt werden (Abbildung 3.4. C, Mitte). Damit konnte gezeigt werden, dass nur in Anwesenheit eines AF4 Proteins es zu einer selektiven Acetylierung des Lys44-Restes und so zur Schlüsselaktivierung des P-TEFb Kinasekomplexes kommt. Gleichzeitig wurde deutlich, dass nur ein Teil des immunpräzipitierten CDK9 tatsächlich acetyliert vorlag (nicht gezeigt), was ein Hinweis darauf ist, dass AF4 - und nicht CDK9 - der limitierende Faktor für die Aktivierung von P-TEFb ist.

Um weiteren Aufschluss über die Regulation dieser Acetylierung im endogenen Kontext zu erhalten, wurden die transient exprimierten Mutanten sowie nicht mutiertes CDK9 als Kontrolle einer Behandlung mit verschiedenen HDAC-Inhibitoren unterzogen. Dabei wurden der Pan-HDAC-Inhibitor TSA (300 nM) sowie ein hochdosierter (50 µM) HDAC-8 spezifischer Inhibitor, SB-379278A, und eine DMSO-Kontrolle eingesetzt⁷²². 24 Stunden nach der Behandlung erfolgte die Analyse des Acetylierungsstatus der CDK9 Varianten mittels Western-Blot aus Gesamtzelllysaten (Abbildung 3.4. D). SB-379278A zeigte einen unabhängigen und relativ geringen Anstieg der Acetylierung des CDK9 unabhängig von der Anwesenheit des ektopisch exprimierten Konstrukte. Diese scheinen nicht durch den

Inhibitor beeinflusst zu werden, da das detektierbare Signal sich nicht von leertransfizierten Zellen (vgl. Gruppe pDF) und damit dem endogenen CDK9 unterscheidet. Sowohl endogenes als auch Flag-markiertes CDK9 konnte dabei distinkt detektiert werden (vgl. Reihe α -CDK9). Somit scheint HDAC8 zwar den Acetylierungsstatus des CDK9 Proteins zu beeinflussen, allerdings konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden, welches der Lysine durch HDAC8 deacetyliert wird.

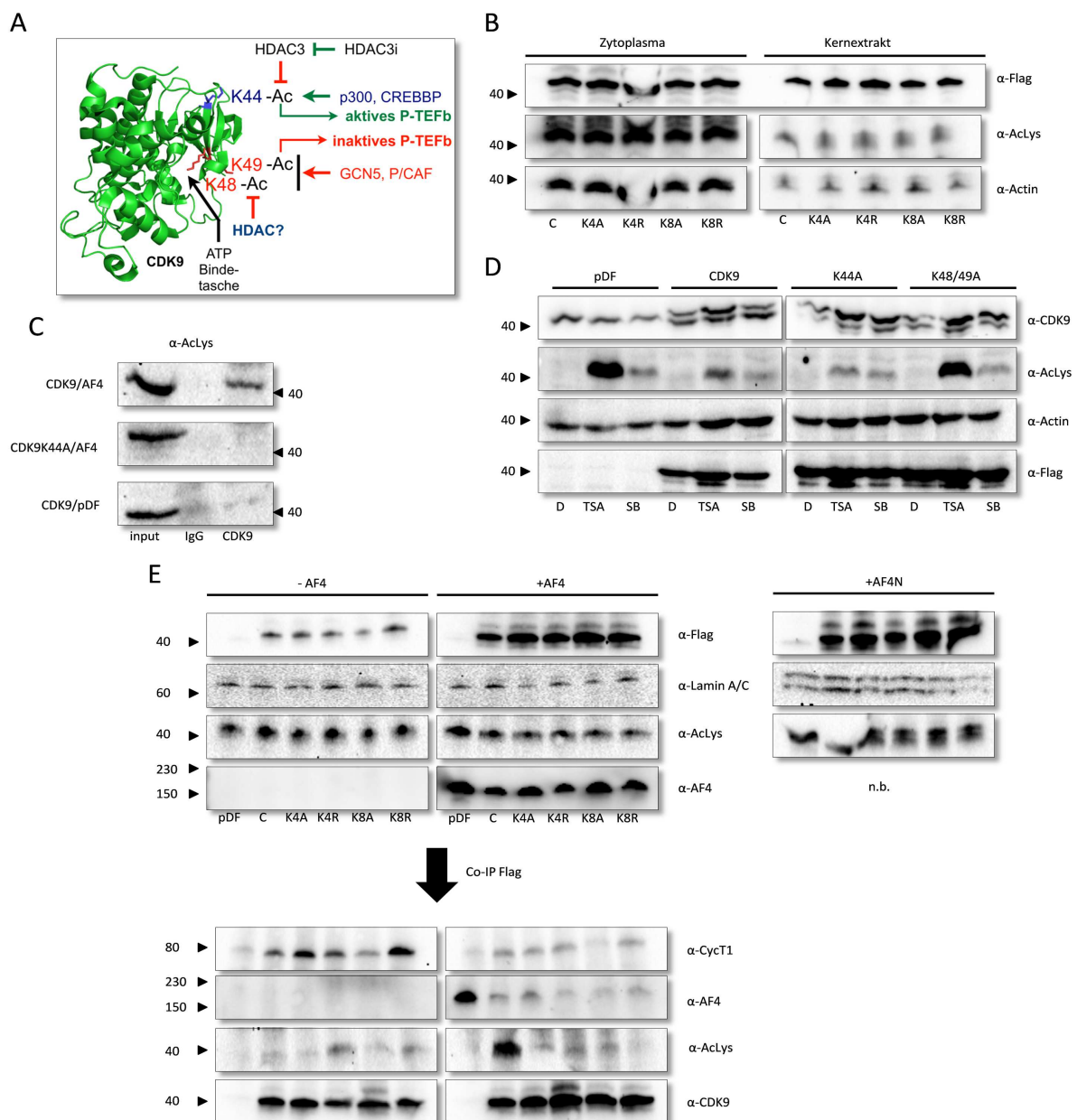
Interessanterweise wurde die Acetylierung durch TSA-vermittelte HDAC Inhibition im Falle eines überexprimierten CDK9, als auch der K44A Mutante, deutlich vermindert (vgl. Reihe α -AcLys). Dies lässt die Vermutung zu, dass HDACs vorrangig die aktivierende Modifikation am Lysin-44 regulieren und damit als Gegenspieler des AF4 auftreten. Da das nicht mutierte CDK9 sich wie die K44A Mutante verhielt, scheinen die Lysine-48 und -49 nur in Abhängigkeit des Lysins-44 überhaupt acetyliert zu werden. Ein Überangebot an CDK9 (s.o.) führt zu mangelnder Acetylierung an Lysin-44 und damit zu einer Blockade der Lysin-48 und -49 Acetylierung.

Abschließend wurden die mutierten Konstrukte sowie nicht mutiertes CDK9 in Abhängigkeit von AF4 in 293T Zellen transient exprimiert. Die Proteine aus den normalisierten Kernfraktionen wurden im Anschluss mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 3.4. E, oben). Aus den Kernfraktionen wurden die Flag-markierten Proteine mittels Immunpräzipitation aufgereinigt und hinsichtlich ihres Acetylierungsstatus und der Interaktionen mit anderen Proteinen weiter analysiert (Abbildung 3.4. E, unten). Eine Co-Transfektion von AF4ST führte zu einer sichtbaren Induktion aller CDK9 Varianten, jedoch analog zu Abbildung 3.4. A nicht zu einer detektierbaren Veränderung des Acetylierungsstatus. Dies konnte erst in einem weiterführenden Versuch, nämlich durch die Expression des AF4N, gezeigt werden (rechts). Vermutlich maskieren die Acetylierungssignale des endogenen CDK9 die der Mutanten, so dass erst durch deren Aufreinigung eine präzise Analyse möglich wird. Dies festigte die Vermutung, dass überexprimiertes CDK9 in der Zelle tatsächlich nur teilweise eingesetzt wird und der verbleibende Überschuss funktionell inaktiv und unmodifiziert vorhanden ist.

Erst in den Eluaten der Immunpräzipitation wurden Unterschiede deutlich. So kommt es in Anwesenheit des AF4 Proteins erneut zu einer massiven Acetylierung des CDK9 Proteins (vgl. Abbildung 3.4. C), während alle CDK9-Mutanten im Vergleich zur Leertransfektion nur geringfügig unterschiedlich modifiziert wurden. Die Mutante K4849A zeigt unabhängig von AF4 nur eine schwache Interaktion mit Bindepartner CycT1, während alle anderen getesteten Konstrukte in Abwesenheit des AF4 Proteins noch P-TEFb bilden konnten. Im Falle einer Co-Transfektion mit AF4ST werden die Interaktionen mit CycT1 deutlich schwächer, so ist sie im Falle der K4849A Mutante nicht mehr detektierbar, jedoch wird AF4

3. Ergebnisse

in jedem Fall co-immunpräzipitiert. Es sind also alle Mutanten in der Lage, zumindest indirekt mit AF4 zu interagieren und mit Ausnahme der K4849A Mutante in einen mindestens ternären AF4-P-TEFb Komplex zu existieren. Diese Ausnahme lässt weiterhin vermuten, dass CDK9 auch unabhängig von CycT1 mit AF4 interagieren kann. Bezüglich des Acetylierungsstatus des CDK9 zeigen diese Ergebnisse, dass die Acetylierung von Lysin-44 sowie -48 und -49 sich gegenseitig bedingen. Nur in Anwesenheit aller drei Lysine kommt es zur AF4-abhängigen Acetylierung. Umgekehrt wirken Deacetylasen vorrangig am Lysin-44 und zeigen keine Abhängigkeit von Lysin-48 und -49. Weiterhin wurde HDAC8 als potentielle Deacetylase von CDK9 identifiziert, auch wenn die genaue Position (44, 48 oder 49) nicht bestimmt werden konnte.



3. Ergebnisse

Abbildung 3.4. Regulation der P-TEFb Acetylierung durch AF4/AF4N. (A) Schematische Darstellung der aktivierend (blau) und reprimierend (rot) acetylierten Lysin Seitenketten sowie der ATP-Bindetasche des CDK9 sowie die zuständigen KATs und HDACs dieser Modifikationen^{432,433}. Proteinmodell entnommen aus PDB-Eintrag 3TN8 (RCSB *protein data base*)⁷²³. (B) Western-Blot Analyse einer Fraktionierung von 293T Zellen in eine zytoplasmatische Fraktion und eine Kernfraktion. Die Zellen wurden transient mit den Flag-markierten CDK9 Konstrukten (C=CDK9; K4A=K44A; K4R=K44R; K8A=K4849A; K8R=K4849R) transfiziert und 48 h nach der Transfektion geerntet und fraktioniert. Die Analyse erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern aus Proteinmengen-normierten Fraktionen. (C) Western-Blot Analyse einer Immunpräzipitation der transient transfizierten Flag-markierten Konstrukte CDK9 und K44A aus normierten Gesamtzelllysaten von 293T Zellen in Abhängigkeit von AF4ST. Dargestellt ist ein Aliquot des eingesetzten Lysats (0,2%) sowie Aliquots der Eluatfraktionen (33%) eines unspezifischen IgG und des spezifischen CDK9-Antikörpers. Die Detektion erfolgte mit dem beschriebenen, spezifischen Acetyl-Lysin-Antikörper. (D) Western-Blot Analyse aus normierten Gesamtzelllysaten von 293T Zellen 48 h nach transienter Transfektion mit den angezeigten, Flag-markierten Konstrukten und 24 h nach Behandlung mit 1% DMSO (Negativkontrolle, D), sowie den HDAC-Inhibitoren TSA [300 nM] (TSA) und SB-379278A [50 µM] (SB). Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern. (E) Western-Blot Analyse aus normierten Kernfraktionen von transient transfizierten 293T Zellen sowie der normierten Eluatfraktionen nach Co-Immunpräzipitation Flag-markierter CDK9 Varianten mittels spezifischen Flag-Antikörper aus den Lysaten. Die Zellen wurden mit den CDK9 Varianten (Erläuterung siehe (B)) sowie einer Leervektorkontrolle (pDF) und AF4ST (mitte) bzw. AF4NST (rechts) transfiziert und 48 h nach der Transfektion geerntet. Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern [n.b.=nicht bestimmt].

3.5. Rekrutierung von P-TEFb aus Speicherkomplexen durch AF4/AF4N

Da AF4 bzw. AF4N einen deutlich aktivierenden Einfluss auf CDK9 bzw. P-TEFb ausüben, wurde im Folgenden überprüft, ob diese Aktivierung auch die Rekrutierung von P-TEFb aus den inhibitorischen Speicherkomplexen beeinflusst. P-TEFb wird als inaktives Dimer zusammen mit zwei HEXIM1 Proteinen sowie den Faktoren MEPCE und LARP7 an der 7SK snRNA gebunden (*P-TEFb storage complex*) (Abbildung 3.5.1. A, siehe Kapitel 2.1.7.2.). Da LARP7 ein fester Bestandteil des 7SK snRNP ist und im physiologischen Kontext nicht von der 7SK snRNA, wohl aber von P-TEFb dissoziiert, kann durch eine Immunpräzipitation des CDK9 und der anschließenden Detektion des co-Immunpräzipitierten LARP7 (und umgekehrt) eine Aussage über den Assoziationszustand dieses Speicherkomplexes getroffen werden. Demzufolge wurden 293T Zellen transient mit Expressionsplasmiden für AF4ST, das HCMV IE-Protein IE1, der durch IE1 induzierten 5-Lipoxygenase (5-LO) sowie einem Leervektor transfiziert und aus den normierten Gesamtzelllysaten CDK9 immunpräzipitiert (Abbildung 3.5.1. B). Die anschließende Detektion von LARP7 in den Präzipitaten zeigte, dass im Falle einer Überexpression von AF4ST und HCMV IE1 es im Vergleich zum Leervektor (NK) zu einem vollständigen Verlust an LARP7 kam, was auf eine weitgehende Dissoziation der Speicherkomplexe rückschließen ließ. Dies galt nicht im Fall einer Überexpression der 5-LO, wodurch unspezifische Effekte durch verstärkte ektopische Expression und einhergehende Rekrutierung des P-TEFb sowie induktive Effekte des HCMV IE1 gegenüber der 5-LO ausgeschlossen werden konnten.

Da die Immunpräzipitation aus Gesamtzelllysaten einen sehr komplexen Vorgang bezüglich der beteiligten Faktoren darstellt, wurde die Rekrutierung in einem vereinfachten *in vitro* System nachgestellt. Dazu wurde Flag-markiertes CDK9 transient in 293T Zellen überexprimiert und nach 48 Stunden durch eine Flag-spezifische, magnetische Affinitätsmatrix stringent aufgereinigt. Die so gereinigten Speicherkomplexe wurden anschließend auf der Matrix mit rekombinanten GST-markierten AF4N, HEXIM1 (als Negativkontrolle) sowie einer kommerziellen RNase als Positivkontrolle inkubiert (Abbildung 3.5.1. C). Die anschließende Auftrennung zwischen Matrix-gebundenen Proteinen (P-TEFb und assoziierte Faktoren) und Überstand (dissoziierte Faktoren) zeigte im Falle der RNase Positivkontrolle ein deutliches Signal für LARP7 im Überstand sowie eine Abschwächung an der Matrix. Dadurch war die Funktionalität des Systems gewährleistet. Dieser Effekt konnte jedoch weder durch die Gegenwart von rekombinantem GST-AF4N noch durch die Gegenwart von GST-HEXIM1 gezeigt werden. Der AF4 N-Terminus ist demzufolge nicht in der Lage, die Rekrutierung des P-TEFb unabhängig durchzuführen, sondern benötigt weitere Faktoren. Dieser Versuch zeigte weiterhin, dass überexprimiertes, nicht-mutiertes CDK9 in

293T Zellen eine funktionelle Rolle spielt und in die P-TEFb Speicherkomplexe integriert wird. Ein analoger Versuch mit zwei funktionellen Mutanten des CDK9 (K4849A - aktivierend, T186A - inaktivierend) zeigte deutlich, dass beide Mutanten nicht mit LARP7 assoziiert sind und daher vermutlich in der Zelle nicht verwendet werden (Abbildung 3.5.1. C, unten).

Um weitere Einsicht in den Mechanismus der Rekrutierung zu erhalten und die physiologische Rolle des AF4N besser zu verstehen, wurden alle weiteren Experimente zu diesem Thema wiederum im komplexeren System der Gesamtzelllysate durchgeführt. In zwei Versuchen sollte der Einfluss des AF4N sowie des AF4ST auf die 7SK snRNA untersucht werden. Dazu wurde ein unbehandeltes Gesamtzelllysate aus 293T Zellen aliquotiert. Die Aliquots wurden mit Matrix-gebundenem, rekombinanten GST, GST-AF4N oder GST-Tat (als Positivkontrolle) inkubiert und die Proteine anschließend von der Matrix eluiert. Aus den Eluaten wurde die RNA präpariert, revers in cDNA transkribiert und mittels quantitativer PCR die Menge an vorliegender 7SK snRNA anhand einer Standardkurve bestimmt (Abbildung 3.5.1. D). Eine Normierung auf β -Actin war in diesem Versuch nicht möglich, da kein β -Actin in den Eluaten nachzuweisen war, was auf die Spezifität der Interaktion hinweist. Es zeigte sich in diesem Versuch, dass rekombinantes GST-AF4N in drei unabhängigen Versuchen signifikant mehr 7SK snRNA bindet als die GST-Kontrolle. GST-Tat zeigte erwartungsgemäß eine noch stärkere Bindung, deren Signifikanz jedoch aufgrund der heterogenen, jedoch stets starken Bindungsmenge nicht berechnet werden konnte.

Die Bindung des AF4N an die 7SK snRNA legt nahe, dass eine solche Interaktion die Rekrutierung des P-TEFb vermitteln könnte. Der zweite Versuch war die Untersuchung der Menge an 7SK snRNA nach Inkubation eines Ganzzelllysats aus 293T Zellen mit GST-AF4N, einem Gesamtzelllysate aus AF4ST überexprimierenden Zellen sowie der kommerziellen RNase mittels quantitativer PCR. Dazu wurden wieder Gesamtzelllysate aliquotiert und mit den einzelnen Proben inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Lysaten präpariert und revers in cDNA transkribiert. Diese cDNA diente als Matrize für die Quantifizierung der Menge an 7SK snRNA und β -Actin RNA in der anschließenden quantitativen PCR. Um unspezifische, RNA-degradierende Effekte auszuschließen und die Komplexität der AF4ST Probe zu berücksichtigen wurde die Menge des 7SK snRNA nicht absolut berechnet, sondern mit der Menge an β -Actin verglichen und der Quotient der Kopienzahl errechnet (Abbildung 3.5.1. E). Es wurde bewusst auf die Verwendung eines affinitätsaufgereinigten AF4ST MPCs verzichtet, da nach den bisherigen Erkenntnissen ein solcher Komplex bereits 7SK snRNA, aber keine β -Actin RNA, enthält und so den berechneten Quotienten verfälschen würde.

3. Ergebnisse

Während nicht behandeltes Gesamtzelllysate einen Quotienten von 32 erreichte, führte die Behandlung mit RNase als Positivkontrolle zu einer drastischen Verringerung des Quotienten auf 0,002. Auch die Inkubation mit GST-AF4N oder dem AF4ST Lysat führte zu einer merklichen Verringerung auf 3 bzw. 6 Kopien 7SK snRNA pro β -Actin Kopie. Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl AF4 als auch AF4N an die 7SK snRNA binden und durch deren Degradation eine Rekrutierung des P-TEFb ermöglichen. Es wurde jedoch auch deutlich, dass AF4N alleine nicht in der Lage ist, diese Rekrutierung durchzuführen, sondern vielmehr abhängig von bislang noch nicht charakterisierten Faktoren ist.

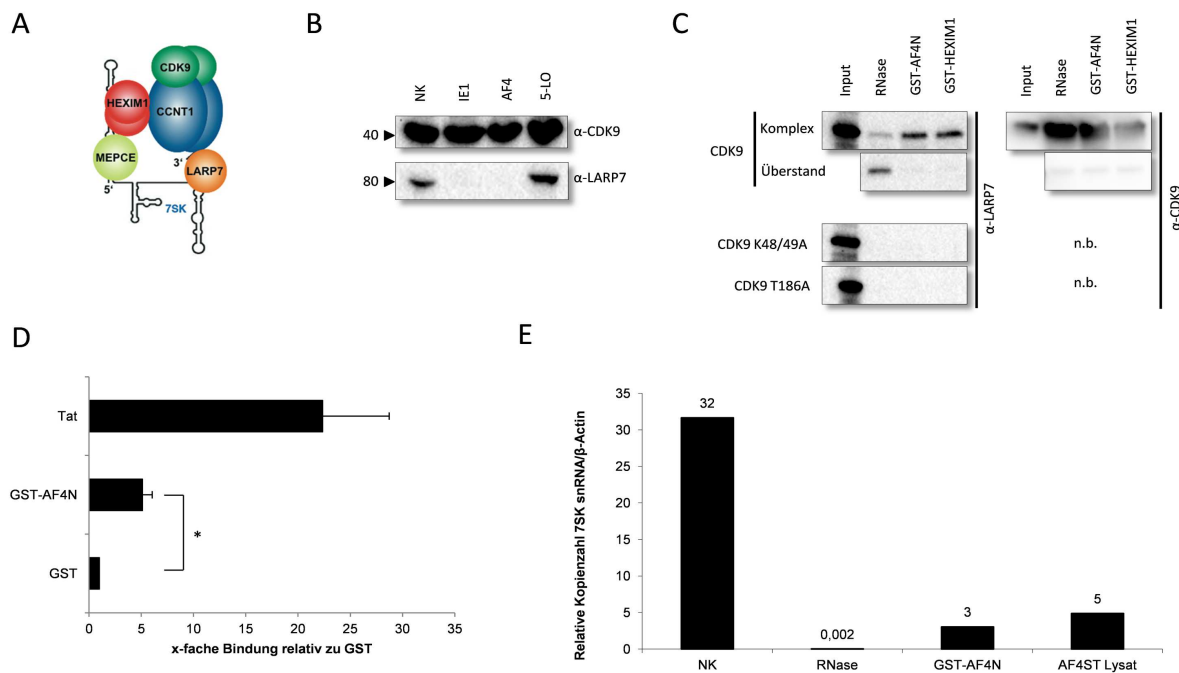


Abbildung 3.5.1. Rekrutierung von P-TEFb aus Speicherkomplexen durch AF4/AF4N. (A) Schematische Darstellung der P-TEFb Speicherkomplexe und der dortigen Interaktionen. LARP7 ist mit der 7SK snRNA sowie CycT1 assoziiert. (B) Western-Blot Analyse der Immunpräzipitation von CDK9 aus Gesamtzelllysaten von transient mit einem Leervektor sowie Expressionsplasmiden für AF4ST, HCMV IE1 oder der 5-Lipoxygenase (5-LO) transfizierten 293T Zellen. Dargestellt sind die Eluatfraktionen (33%). Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern. (C) Western-Blot Analyse der *in vitro* Rekrutierungsversuche. Dazu wurden Flag-markiertes CDK9 (oben) oder K4849A bzw. T186A (unten) transient in 293T Zellen überexprimiert, 48 h nach der Transfektion die P-TEFb-assoziierten Speicherkomplexe mittels einer Flag-spezifischen, magnetischen Affinitätsmatrix aufgereinigt und im Falle des CDK9 auf der Matrix mit den gezeigten Proben inkubiert. Anschließend wurden die Matrix-gebundenen Proteine und der Überstand aufgetrennt und analysiert. Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern [n.b.=nicht bestimmt]. (D) Ergebnisse der quantitativen PCR zur Untersuchung der Bindung der 7SK snRNA an GST, GST-AF4N und GST-Tat. 293T Zellen Gesamtzelllysate wurde mit den Matrix-gebundenen Proteinen inkubiert. Anschließend wurden die Proteine abgetrennt, eluiert und die RNA aus den Eluaten präpariert. Aus der RNA wurde cDNA revers transkribiert und in der quantitativen PCR auf die Menge an 7SK snRNA verglichen mit einer Standardkurve untersucht. Dargestellt ist die x-fache Bindung von GST-AF4N und GST-Tat relativ zu GST [n=3, +S.E.M., *p<0,05]. (E) Ergebnisse der quantitativen PCR zur Untersuchung der 7SK snRNA Menge in Gesamtzelllysaten aus 293T nach Inkubation mit einer RNase, GST-AF4N sowie eines AF4ST enthaltenden Zelllysats. Dazu wurde analog zu (D) ein Lysat erstellt

3. Ergebnisse

und mit den Proben inkubiert. Anschließend wurde die RNA präpariert, in cDNA revers transkribiert und in der quantitativen PCR mittels einer Standardkurve auf die Menge an 7SK snRNA sowie β -Actin RNA untersucht. Dargestellt ist der Quotient aus den Kopienzahlen an 7SK snRNA und β -Actin RNA.

Um die Rekrutierung des P-TEFb aus den Speicherkomplexen und den Übergang zum freien P-TEFb Komplex mit geringerem Molekulargewicht zu veranschaulichen, wurden anschliessend Glycerolgradientenexperimente sowie Hoch/Niedrigsalz-Fraktionierungen aus Gesamtzelllysaten von transient mit einem Leervektor (NK), AF4ST oder AF4NST transfizierten 293T Zellen durchgeführt. Die normierten Gesamtzelllysate wurden auf einen vollständig abgesetzten, stufenweisen 0-40%-igen Glycerolgradienten aufgegeben und für 21 Stunden bei 4°C in die Matrix ultrazentrifugiert. In diesem Gradienten erfolgt die Auftrennung der Proteine und ihrer gebildeten Komplexe nach deren Größe bzw. Molekulargewicht, wobei größere Komplexe gemäß der steigenden Viskosität in frühen, niedrigprozentigen Eluatfraktionen auftauchen und kleine Komplexe in den späteren Fraktionen. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Fraktionen einzeln abgenommen, separiert und durch Western-Blots analysiert. Ein Aliquot der Fraktionen wurde einer Immunpräzipitation durch einen AF4-spezifischen Antikörper unterzogen, um die funktionelle Assoziation des P-TEFb mit AF4 nachzuweisen.

In diesen Versuchen zeigte sich deutlich, dass die Expression von AF4ST und auch AF4NST zu einer Umverteilung des P-TEFb zwischen distinkten Komplexen führt (Abbildung 3.5.2. A). In mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen zeigt CDK9 eine gleichmäßige Verteilung über die Gradientenfraktionen, wobei zwischen einer LARP7-freien Population (Fraktionen 6-10, freies P-TEFb) und einer etwas geringeren LARP7-assoziierten Population (Fraktionen 2-5, Speicherkomplexe) unterschieden werden konnte. Die Expression von AF4ST als auch AF4NST führte zu einer starken Retention des CDK9 aus den späten Fraktionen hin zu frühen Fraktionen (3-6), also höhermolekularen Komplexen. Diese Fraktionen fielen genau mit den AF4/AF4N-enthaltenden Fraktionen zusammen, was darauf hindeutete, dass CDK9 nun in den AF4/AF4N MPCs integriert vorliegt (siehe Spur α -CDK9 oben und α -AF4, rote Pfeile/Kästen). Um die tatsächliche Assoziation nachzuweisen wurde AF4/AF4N immunpräzipitiert und die Eluate im Western-Blot auf die Anwesenheit des CDK9 geprüft (siehe Spur α -CDK9 unten). Dies konnte in allen Fällen bestätigt werden. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass sich LARP7 aus den frühen Fraktionen, welche die Speicherkomplexe repräsentieren, in späte Fraktionen verlagerte, die P-TEFb freie Speicherkomplexe darstellen können (siehe Spur α -LARP7, blaue Pfeile).

Gemäß den Arbeiten von Fujinaga *et al*⁷²⁴ wurde weiterhin eine Salzfractionierung von transient mit einem Leervektor oder AF4ST transfizierten 293T Zellen durchgeführt (Abbildung 3.5.2. B). Dabei werden die Zellen erst in einem Niedrigsalz-Puffer (15 mM KCl)

3. Ergebnisse

lysiert um die 7SK snRNPs als freie nukleäre Fraktion zu isolieren und die verbliebenen Nuklei mit einem Hochsalz-Puffer (420 mM NaCl) ausgewaschen, um Chromatin-assoziiertes, freies P-TEFb zu isolieren. Interessanterweise führte die Expression von AF4ST zu keiner messbaren Veränderung der Verteilung des CDK9 in den Fraktionen, sorgte aber für eine deutliche Relokalisation des CycT1 aus den Niedrigsalzfraktionen (RQ 1:0,23) und damit aus dem 7SK snRNP hin zu freiem P-TEFb. Gleichzeitig wurde LARP7 aus ebendieser Fraktion verdrängt (RQ 1:0,52). Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass AF4 in der Lage ist, P-TEFb aus den Speicherkomplexen zu verdrängen und zu im AF4 MPC zu komplexieren.

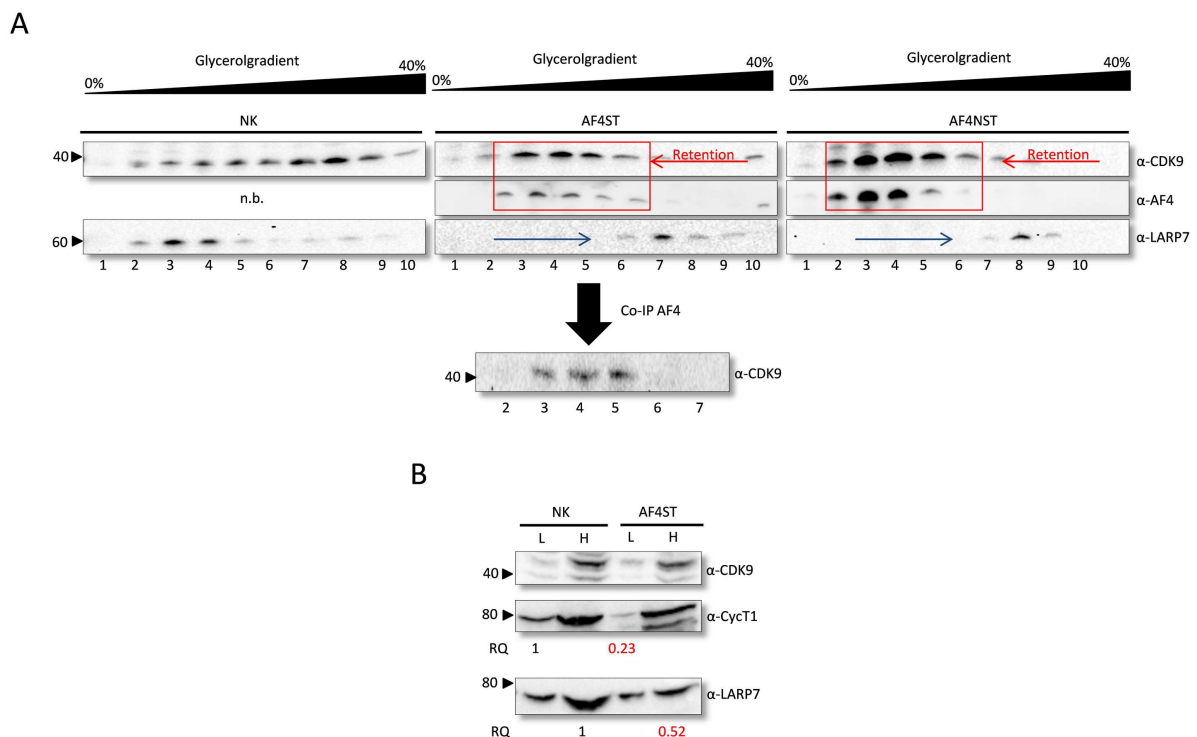


Abbildung 3.5.2. P-TEFb Rekrutierung und Errichtung von AF4-P-TEFb Komplexen. (A) Oben: Western-Blot Analyse von normierten Gesamtzelllysaten aus transient mit einem Leervektor (NK), AF4ST oder AF4NST transfizierten 293T Zellen, welche mittels 21-stündiger Ultrazentrifugation über einen stufenweisen, 0-40%igen Glycerolgradienten aufgetrennt wurden. Die Gradienten wurden in 10 Fraktionen aufgetrennt und mittels der beschriebenen, spezifischen Antikörper analysiert [n.b.=nicht bestimmt]. Unten: Western-Blot Analyse von CDK9 in der Eluat-Fraktion (33%) einer Immunpräzipitation des AF4 mittels spezifischen AF4-Antikörpers aus den gezeigten Fraktionen (2-7) des Glycerolgradienten. (B) Western-Blot Analyse von Zellzahl-normierten Salzfraktionierungen aus transient mit einem Leervektor (NK) oder AF4ST transfizierten 293T Zellen. Die Zellen wurden in zwei Stufen fraktioniert. Dabei wurde zuerst einen Niedrigsalz-Fraktion (L) zur Isolierung freier, nukleärer 7SK snRNPs isoliert und anschließend in einer Hochsalz-Fraktion (H) das Chromatin-assoziierte, freie P-TEFb isoliert. Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern. Die relative Quantifizierung wurde *in silico* mittels Image Lab 3.0 (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt, wobei die jeweiligen NK-Fraktionen als 100%=1 gewichtet wurden.

Abschließend wurde durch *in vitro* Fluoreszenzmikroskopie die oben beschriebene Re-Lokalisation des P-TEFb am Beispiel von einem BFP-markierten CycT1 visualisiert (Abbildung 3.5.3). Dazu wurden 293T Zellen transient mit konstitutiven Expressionsvektoren für BFP-markiertes CycT1, GFP-markiertes HEXIM1 und/oder mCherry-markiertes AF4ST transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion ohne vorherige Fixierung unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Zur besseren Visualisierung und zur Minimierung von Überschneidungen wurden die Bilder absolut uniform mit den entsprechenden Farbfiltern behandelt, stärker kontrastiert und aufgehellt. In den Transfektionen wurden drei Situationen dargestellt, eine repressive Situation durch gleichzeitige Expression von BFP-CycT1 und GFP-HEXIM1 (Abbildung 3.5.3, oben), eine aktivierende Situation durch gleichzeitige Expression von BFP-CycT1 und AF4ST-mC (Abbildung 3.5.3., Mitte) sowie eine kompetitive Situation durch die gleichzeitige Expression aller drei Konstrukte (Abbildung 3.5.3., unten). Zum Abgleich einer alleinigen Expression von BFP-CycT1 in Abhängigkeit von AF4/AF4N wird auf Abbildung 3.3. D verwiesen.

Die artifizielle Erstellung der repressiven Situation führte in GFP-HEXIM1 exprimierenden Zellen zu einer deutlich fokussierten und punktierten Lokalisation des BFP-CycT1 im Zellkern, wenn man sie mit BFP-CycT1 als auch mit zusätzlich AF4-mC exprimierenden Zellen vergleicht (vgl. Abbildung 3.5.3. oben und Mitte, Blauer Filter; sowie Abbildung 3.3. D). Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass in Gegenwart von HEXIM1 das CycT1 Protein in den Speicherkomplexen verbleibt und somit eine Bindung an transkriptionell aktive Genloci im Zellkern unterbindet; diese Situation ist völlig konträr in Gegenwart des AF4-mC Proteins. Hier kommt es zu einer deutlich diffuseren, jedoch auch auf definierte Loci beschränkten Verteilung im Zellkern. Die Anwesenheit von Fluoreszenzsignalen in beiden Filtern, die im jeweils anderen Filter nicht detektierbar waren, deutet darauf hin, dass es sich nicht um eine unspezifische Einstrahlung aus dem anderen Emissionsspektrum handelt, sondern vielmehr um eine spezifische Lokalisation der hier untersuchten, markierten Proteine.

In der kompetitiven Situation (Anwesenheit aller drei Proteine) lassen sich deutlich zwei unterschiedliche Zellpopulationen definieren. Zellen mit einer schwachen oder keiner Expression des AF4-mC zeigen in Anwesenheit von HEXIM1 analog zur repressiven Situation eine stark punktierte Lokalisation des BFP-CycT1 (Abbildung 3.5.3. unten, grüner Pfeil). Zellen, in denen jedoch sowohl GFP-HEXIM1 als auch AF4-mC exprimiert werden, zeigen erneut eine eher diffuse und intensive Verteilung der Fluoreszenz des BFP-CycT1 (Abbildung 3.5.3. unten, roter Pfeil), die ähnlich, aber nicht vollständig identisch, mit der aktivierenden Situation ist. Es herrscht hier vermutlich ein starker Wechsel zwischen HEXIM1-gebundenen P-TEFb und der Inkorporation in die Speicherkomplexe sowie der

3. Ergebnisse

AF4-vermittelten Rekrutierung in den AF4-MPC. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass HEXIM1 in massenspektrometrischen Versuchen auch als Teil des AF4 MPC gefunden wurde⁴⁸⁶, was die transiente Natur der Interaktionen zwischen CycT1, HEXIM1 und AF4 unterstreicht.

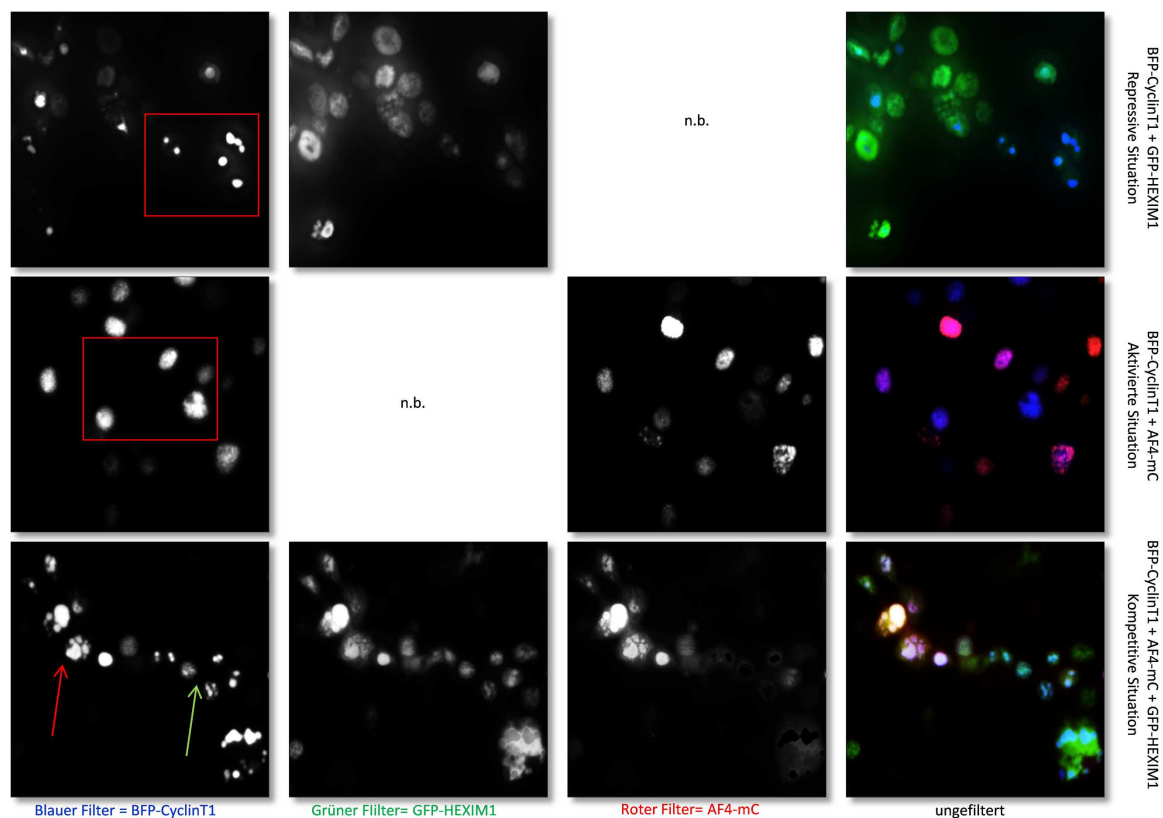


Abbildung 3.5.3. *in vitro* Fluoreszenzmikroskopie der P-TEFb Rekrutierung. 293T Zellen wurden transient mit Expressionskonstrukten für BFP-CycT1, GFP-HEXIM1 und AF4-mC in verschiedenen Kombinationen transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die nicht fixierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und abfotografiert. (100-fach vergrößert, repräsentativer Bildausschnitt, Belichtung BFP 0,2 s, GFP 0,5 s, RFP 1 s. Alle Bilder sind absolut uniform nachbearbeitet durch einen farb-spezifischen Schwarz/Weiß-Filter sowie durch 50%ige Erhöhung von Belichtung und Kontrast). Die unterschiedliche Lokalisation und die beiden Populationen der Zellen im Falle des kompetitiven Situation des BFP-CycT1 sind gekennzeichnet (rote Kästen, roter Pfeil, grüner Pfeil). Eine gleichzeitige DAPI-Färbung des Zellkerns war aufgrund des Auftretens starker Interferenzen mit dem BFP-Filter nicht möglich [n.b.=nicht bestimmt].

3.6. Vermehrung zellulärer RNA durch Transkriptionsaktivierung

Um eine funktionell relevante Messgröße für die Aktivierung der Transkription zu bestimmen wurde angenommen, dass die AF4-vermittelten Effekte auf P-TEFb zu einer verstärkten Auflösung des Elongationsarrests der RNAP II und damit zu mehr produktiver Elongation führen sollten. Dies bedingt eine erhöhte Produktion von hnRNA und zeitlich verzögert die Bildung von mehr mRNA. Um dies zu belegen wurden 293T Zellen transient mit einem Leervektor (pT) bzw. einem dTomato Expressionsplasmid (pDTF) sowie Expressionsplasmiden für AF4ST und das dTomato-markierte HCMV IE1 transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion auf ihren zellulären Gesamtgehalt an mRNA hin untersucht. Da eine transiente Transfektion keine homogene Zellpopulation erzeugt und die erwarteten Effekte auf die gesamte RNA Menge in den Zellen keine mehrfache Induktion derselben hervorrufen, wurden die Zellen vor der Präparation der RNA an einem FACS auf ihre rote Fluoreszenz hin stringent sortiert (Abbildung 3.6. B zeigt ein exemplarisches Sortierergebnis). So wurden nur lebende, vereinzelte Zellen verwendet, welche eine Fluoreszenz von wenigstens 1500 relativen Einheiten aufzeigten. Anschließend wurden die homogenen Populationen der verschiedenen Proben gezählt, auf ihre Zellzahl hin normiert und die Gesamt-RNA aus den Zellen präpariert (Abbildung 3.6. A). Zur besseren Darstellung erfolgte die endgültige Auftragung als Relation von ng RNA pro 1000 Zellen.

Aus den erhaltenen Relationen konnten zwei wesentliche Aussagen abgeleitet werden. Zum Einen führte die Expression des AF4ST zu einer Erhöhung der Gesamt-RNA in den Zellen, auch wenn deren Signifikanz aufgrund der komplexen Methodik nicht belegt werden konnte. Zum Anderen führt die Co-Expression des HCMV IE1 zu einer weiteren, signifikanten Erhöhung der RNA Menge, was auf einen kooperativen Mechanismus zwischen AF4 und IE1 in der Aktivierung der Transkription hindeutet. Dieser Effekt kann durch eine alleinige Überexpression von IE1 oder der beiden Leervektoren nicht erreicht werden, wodurch Promotor- oder generelle Überexpressions-vermittelte Effekte auszuschließen sind. Der Effekt einer Transkriptionsaktivierung kann auch durch *in vitro* dTomato-Fluoreszenzmikroskopie in den transfizierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.6. C). So kommt es durch eine Co-Transfektion mit AF4 zu einer verstärkten Fluoreszenz sowohl im Falle des pDTF (siehe AF4/-) als auch des IE1-dTomato Konstrukts (siehe AF4/IE1). Weiterhin konnte so die korrekte Lokalisation des markierten IE1 im Zellkern nachgewiesen werden, während dTomato diffus im Zytoplasma lokalisiert war.

3. Ergebnisse

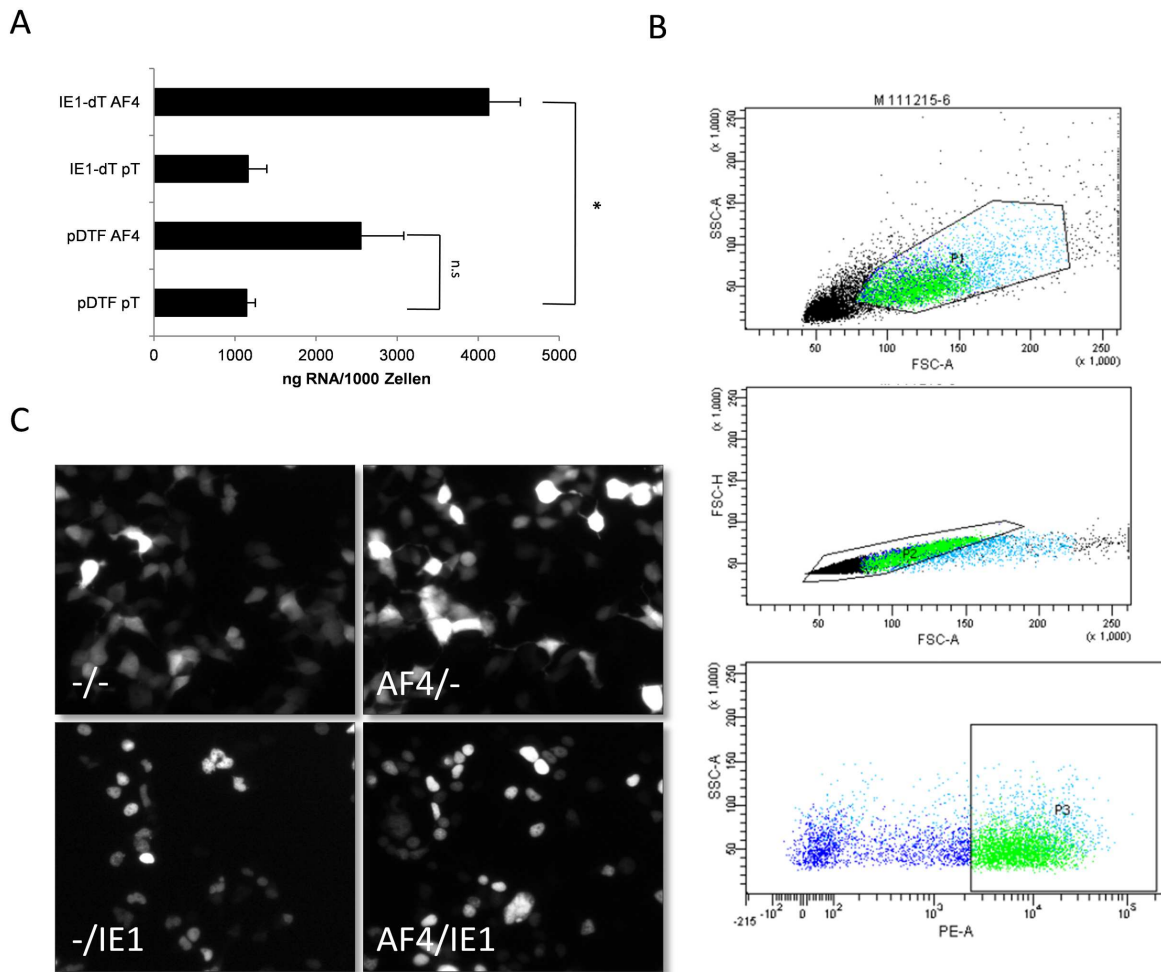


Abbildung 3.6. Erhöhung der zellulären RNA Menge durch Transkriptionsaktivierung. (A) Ergebnisse der Gesamt-RNA Präparation aus den sortierten, Zellzahl-normierten Zellpopulationen. 293T Zellen wurden mit einem Leervektor (pT) sowie Expressionsvektoren für dTomato (pDTF), AF4ST und HCMV IE1 transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion mittels eines FACS auf die Fluoreszenz des dTomato sortiert. Die präparierte RNA wurde in Relation zu der eingesetzten Zellzahl gesetzt, die Auftragung erfolgt als ng RNA/1000 Zellen [n=3, +S.E.M., *=p<0,05, n.s.=nicht signifikant]. (B) Repräsentatives Ergebnis eines Sortiervorgangs. Die Zellen wurden in drei Stufen sortiert. Zuerst erfolgte die Isolation lebender Zellen aufgrund der Teilchenform (FSC-A/SSC-A), dann daraus die Isolation vereinzelter Zellen (FSC-A/FCS-H) und abschließend die Einschränkung auf solche Zellen, die eine relative Fluoreszenz von wenigstens 1500 Einheiten zeigten (PE-A/SSC-A). (C) *in vitro* dTomato-Fluoreszenzmikroskopie der transfizierten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Zellen sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht sortiert (100-fach vergrößert, repräsentativer Bildausschnitt, Belichtung 1 s. Alle Bilder sind absolut uniform nachbearbeitet durch einen rot-spezifischen Schwarz/Weiß-Filter sowie durch 50%ige Erhöhung von Belichtung und Kontrast).

3.7. AF4 als Ko-Faktor viraler IE Proteine

In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass AF4 ein potenter Aktivator der Transkription über die Aktivierung des P-TEFb Kinasekomplexes ist. Damit einhergehend kommt es zum Übergang der RNAP II zur produktiven Elongation und der Produktion funktioneller mRNA. Ausgehend von diesen Erkenntnissen stellte sich die Frage, ob diese fundamentale Rolle des AF4 auch von exogenen Faktoren, genauer von den IE Proteinen der dsDNA-Viren, genutzt wird, um die Einleitung der eigenen Replikation zu verbessern, bzw. um die lytischen Phase zu initiieren. Die IE Proteine sind die ersten viralen Faktoren, die komplexe Genexpressionsprogramme einleiten, in deren Folge sukzessiv zunächst die Bildung der *early* und *late* Produkte dieser Viren und schlussendlich die Assemblierung und Freisetzung neuer viraler Partikel steht. Dass solche Viren sich der Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle bemächtigen, war bekannt. Daher lag es nahe zu fragen, ob auch die zelluläre Maschinerie der Elongationskontrolle und damit das AF4 Protein als deren zentraler Faktor von den gleichen viralen IE Proteinen in Beschlag genommen wird. Es konnte bereits in den Kapiteln 3.5. und 3.6. ein Einfluss durch das HCMV IE1 Protein auf AF4-vermittelte Effekte gezeigt werden.

Um diese Untersuchungen durchzuführen wurde von verschiedenen IE Proteinen der Familie der Herpesviren (HSV-1 ICP, KSHV Rta, HCMV IE1 und IE2, EBV BZLF1 und BRLF1, Rhadinovirus ORF45) und des HPV16 (E2, E6, E7, E8, E8^ΔE2C, E6/7) (Abbildung 3.7.1. A) eine Reihe von Expressionsplasmiden erstellt, welche in einem bereits in HeLa Zellen etablierten, Firefly Luciferase-basierten Reportersystem^{725,726} auf ihre Funktion zur Aktivierung der Transkription in Abhängigkeit von AF4 getestet wurden. Das Reportersystem verwendet ein artifizielles Promotorfragment der 5-LO (pN10), welches vor einem Luciferasegen kloniert vorlag. Die Verwendung dieser 5-LO abgeleiteten Struktur war insofern sinnvoll, als das zum Einen die IE Proteine des HCMV als potente, 5-LO Promotor-aktivierende Proteine beschrieben waren⁷²⁷ und zum Anderen die Expression der 5-LO vorrangig in hämatopoetischen Zellen (Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten) stattfindet, die auch Aufenthaltsorte der untersuchten Viren sowie relevant für die Entwicklung der AF4-involvierenden t(4;11)-Translokation sind. Zusätzlich zu diesem speziellen Promotorkonstrukt wurde ein weiteres Reporterplasmid eingesetzt, der die Promotor-lose CDS der 5-LO, einschließlich zweier Introns (J, M) welche transkriptionelle Funktionen vermitteln, vor dem gleichen Luciferasegen trägt (pGL3cdsInJM). Durch dieses Konstrukt sollen Promotor-unabhängige Effekte gezeigt werden. Die Normierung der Lumineszenz erfolgte in beiden Fällen durch die gleichzeitige Transfektion eines Expressionsplasmids, welches über einen SV40 Promotor konstitutiv eine Renilla Luciferase exprimiert (pSV40-Renilla).

Eingangs wurden alle Expressionsplasmide zusammen mit dem pN10 Reporterplasmid sowie einem Leervektor (pT), AF4 oder AF4-MLL (der4) transient in HeLa Zellen transfiziert und nach 48 Stunden über das kommerzielle *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega) ausgewertet (Abbildung 3.7.1.B). Grundlegend ließen sich zwei Aussagen aus diesem Screening-Experiment ableiten. Zum Einen zeigen nur die IE Proteine der Herpesviren, nicht die des HPV16, eine relevante Induktion auf das Promotorkonstrukt, zum Anderen war nur die Induktion im Falle der EBV IE Proteine Zta (codiert durch BZLF1) und Rta (codiert durch BRLF1) auffällig. Weiterhin waren die Effekte des AF4 und AF4-MLL in Relation zu dem Leervektor erstaunlich gering und nicht signifikant, wobei AF4-MLL durchgehend eine etwas stärkere Induktion als AF4 zeigte.

Aus diesen Ergebnissen und den vorherigen Untersuchungen unter Einbezug des HCMV IE1 heraus wurden die IE Proteine des EBV und des HCMV zur weiteren Untersuchung ausgewählt. In analogen Reportergerätenversuchen wurden deren Expressionskonstrukte, die Reporterkonstrukte sowie pT, AF4 und AF4-MLL vergleichend in HeLa Zellen als auch in die AF4kd V100 Zelllinie transfiziert und die Lumineszenz vermessen. In diesen Versuchen sollte die Abhängigkeit des Systems von endogenem AF4 gezeigt werden (Abbildung 3.7.1. C). Tatsächlich kommt es in jedem Ansatz in den *knock-down* Zellen zu einer drastischen Reduzierung der relativen Lumineszenz (RLU) bis auf die Ebene des Hintergrundes (<100), so dass keine Auswertung der x-fachen Induktion erfolgte. Damit konnte gezeigt werden, dass das hier verwendete System obligat von einem stabilen endogenen Niveau des AF4 abhängig ist und die viralen IEs nicht in der Lage sind, das Reporterkonstrukt unabhängig zu induzieren. Interessanterweise führte weder die Transfektion von AF4 noch von AF4-MLL zu einer Komplementation des Gesamtsystems. Ein fast identischer Effekt wurde beobachtet, wenn das Reporterkonstrukt pN10 gegen das promotorlose pGL3cdsInJM getauscht wird (Abbildung 3.7.1. D). Auch in diesem Fall fällt die RLU auf ein nicht mehr effektiv auswertbares Niveau ab, dass nicht durch eine gleichzeitige Transfektion von AF4 oder AF4-MLL gesteigert werden kann. Um ein Versagen des Reportergerätenversuchs durch den Eintritt von Seneszenz im Falle des AF4kd V100 Zellen auszuschließen, wurden die Zellen durch β -Galactosidasefärbung auf Seneszenz untersucht. Dabei wurden die Zellen als nicht seneszent, also ungefärbt, gefunden (nicht gezeigt).

Aufgrund der fehlenden Aktivierung des pGL3cdsInJM Reporterkonstrukts sollte abseits der Effekte der viralen IE Proteine der Effekt von AF4 in Kontext mit HIV Tat untersucht werden. Die Interaktion von Tat mit dem P-TEFb und der Effekt auf den Prozess der Transkriptionselongation ist bereits ausführlich in der Literatur beschrieben worden. Da pGL3cdsInJm ein promotorloses Konstrukt darstellt, können transaktivierende Effekte nur unabhängig von der Initiation auftreten. Es wurden dazu analoge Reportergerätenversuche unter

Verwendung des pN10 oder des pGL3cdsInJM Reporterkonstrukts zusammen mit AF4 oder dem Leervektor (pT) sowie HIV Tat durchgeführt (Abbildung 3.7.1. E). Dabei wurde ein überraschendes Ergebnis erzielt. Die Induktion der Luciferaseexpression erfolgte nur in der Kombination von Tat und AF4 auf dem promotorlosen Reporterkonstrukt und dies war signifikant gegenüber allen anderen Kombinationen. Ein drittes Reporterkonstrukt, welches den pN10 Promotor und die CDS der 5-LO kombiniert (pN10cdsInJM), zeigte identisch zu pN10 keine Induktion durch Tat, AF4 oder eine Kombination beider (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die aktivierenden Effekte des AF4 und auch des AF4-MLL gegenüber der Transkription in Kooperation mit IE Proteinen der Herpesviren über einen funktionellen Promotor vermittelt werden. Dabei zeigen vor allem EBV Zta und Rta deutliche Effekte. Weiterhin wird aus den Daten der *knock-down* Zellen deutlich, dass diese Effekte direkt von endogenem AF4 und nur unwesentlich von exogenem AF4 abhängig sind. Da eine Überexpression von AF4 oder AF4-MLL nicht zum Wiederanstieg der relativen Lumineszenz führte, scheint die effektive Transkription nur über bereits im Voraus assemblierte Elongationskomplexe vermittelt zu werden. Im Falle des HIV-1 sind die Effekte des AF4 in Kooperation mit Tat distinkt. Eine Induktion erfolgt zum Einen nur kooperativ zwischen AF4 und Tat und zum Anderen nur auf einem promotorlosen Konstrukt, also unabhängig von einer Initiation am Promotor. Weiterhin führt die Einführung eines Promotors vor das promotorlose Reporterkonstrukt zum Verlust der Induktion durch AF4 und Tat. Dies weist darauf hin, dass Tat in Abhängigkeit von AF4 in der Lage ist, artifizielle oder kryptische Promotoren in der CDS zu aktivieren. Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass neben den gezeigten Versuchen auch Experimente bzgl. einer potentiellen Synergie von Rta und Zta bzw. IE1 und IE2 durchgeführt wurden. Ein solcher Effekt konnte jedoch in beiden Fällen nicht gezeigt werden (nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

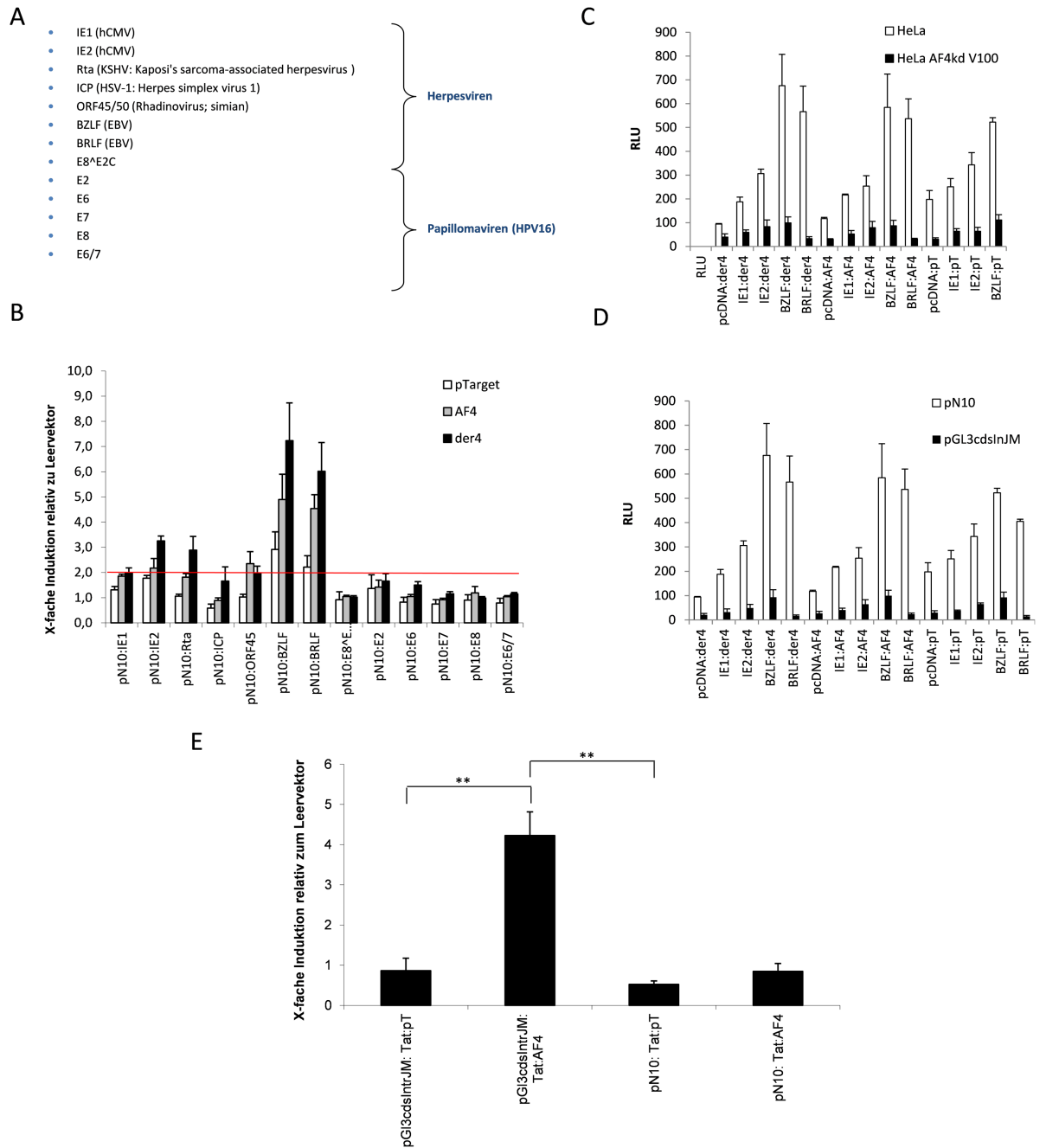


Abbildung 3.7.1. Reporter-genversuche zur Identifizierung mit AF4 kooperierender viraler IE Proteine. (A) Vorstellung und Klassifizierung der in den Reporter-genversuchen eingesetzten viralen IE Proteine. **(B)** Ergebnis der Lumineszenz-basierten Reporter-genversuche unter Verwendung des pN10 Reporterkonstrukts. HeLa Zellen wurden 48 Stunden vor der Messung der Lumineszenz transient mit den Expressionsplasmiden der IE Proteine, den Reporterkonstrukten pN10 und pSV40-Renilla sowie einem Leervektor (pT), AF oder AF4-MLL (der4) transfiziert. Dargestellt ist die x-fache Induktion der relativen Lumineszenz in Relation zu dem Leervektor der viralen Expressionsplasmide [n=3, +S.E.M.]. **(C)** Zu **(B)** analoge Reporter-genversuche unter Verwendung von HeLa Zellen sowie AF4kd V100 Zellen. Dargestellt sind die relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) aus der Relation Firefly/Renilla Luciferase [n=3, +S.E.M.]. **(D)** Zu **(B)** analoge Reporter-genversuche unter Verwendung des Reporterkonstrukts pGL3cdsInJM anstelle von pN10. Dargestellt sind die relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) aus der Relation Firefly/Renilla Luciferase [n=3, +S.E.M.]. **(E)** Zu **(B)** analoge Reporter-genversuche unter Verwendung beider Reporterkonstrukte pN10 oder pGL3cdsInJM sowie eines Expressionsplasmides für HIV-1

3. Ergebnisse

Tat zusammen mit einem Leervektor (pT) oder AF4. Dargestellt ist die x-fache Induktion der relativen Lumineszenz in Relation zu dem Leervektor der viralen Expressionsplasmide [n=3, +S.E.M.].

Aufgrund der beobachteten Effekte kann vermutet werden, dass die viralen IE Proteine eine *bis dato* nicht beschriebene Wechselwirkung mit AF4 aufzeigen. Um dies näher zu untersuchen, wurde die potentielle Assoziation der ausgewählten IE Proteine mit dem AF4 MPC untersucht. Dazu wurden Expressionsplasmide der RFP-markierten HCMV IE1, EBV BZLF1 oder des HPV16 E6/7 Onkoprotein transient in die TCZP-AF4ST Zelllinie transfiziert und 48 Stunden nach induzierter Expression des AF4ST der jeweilige AF4-MPC aufgereinigt. Die Analyse der Aufreinigung mittels Western-Blot zeigte eine starke Erhöhung der AF4 Menge in den Zellen in Abhängigkeit der Expression der viralen Proteine, wobei IE1 und Zta erwartungsgemäß eine deutlich stärkere Expression des AF4 förderten (Abbildung 3.7.2. A, links). Gleichzeitig konnte über Detektion des RFP für IE1 eine direkte Inkorporation in den AF4 MPC gezeigt werden, IE1 co-eluierte in mehreren Fraktionen zusammen mit AF4 (Abbildung 3.7.2. A, rechts und B). Die Erhöhung der AF4 Menge führte dabei im gleichen Maß zur Bildung funktioneller MPCs, wie an der gleichzeitigen Erhöhung der Menge an detektierbaren CDK9 und CycT1 in den aufgereinigten Komplexen deutlich wird (Abbildung 3.7.2. B). Dies galt jedoch nicht für das HPV E6/7 Onkoprotein. Abbildung 3.7.2. C zeigt die Gesamtmenge an erhaltenem Protein in einer exemplarischen Aufreinigung, an der deutlich deren vierfache Erhöhung durch Co-Transfektion des IE1 und eine zweifache Erhöhung im Falle des Zta bzw. E6/7 deutlich wird. Die korrekte Lokalisation des IE1 sowie die Expression des IE1 und des AF4 wurde durch *in vitro* GFP/RFP-Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abbildung 3.7.2. D). Damit konnte gezeigt werden, dass die IE Proteine des HCMV und des EBV die AF4 MPCs induzieren und somit das verfügbare Niveau funktioneller Elongationskomplexe anheben.

Um zu vermeiden, dass die induktiven Effekte der viralen IE Proteine gegenüber AF4 auf eine artifizielle Induktion der Promotoren der Expressionsplasmide zurückzuführen ist, wurden die verwendeten Promotoren des *EF1 α* , *PGK*, *TRE2* Gens und HCMV selbst *in silico*⁷²⁸ auf Bindungsstellen mehrerer relevanter Transkriptionsfaktoren (AP-1, ATF-2, SP1) hin untersucht. Während der *EF1 α* Promotor und der des CMV jeweils eine signifikante AP-1 Bindestelle aufweisen, gilt dies nicht für den *PGK* und vor Allem nicht für den *TRE2* Promotor. ATF-2 zeigte in keinem der Promotoren eine signifikante Bindestelle. Da die Verwendung beider Expressionsplasmide eine vergleichbare Induktion des AF4 zeigt, scheint es sich nicht um eine Promotor-gestützte Induktion sondern auf eine tatsächliche Stabilisierung auf der Ebene der Proteine zu handeln. Eine Induktion der AF4 mRNA wurde weder im endogenen Kontext noch bei Überexpression festgestellt (nicht gezeigt). Weiterhin ist für Zta beschrieben, dass nur stark methylierte, reprimierte Promotoren tatsächlich transaktiviert werden können^{666,667}, die im Falle der ektopischen Expression i.d.R. nicht

3. Ergebnisse

vorliegen. Rta benötigt hingegen für seine transaktivierende Funktion gegenüber den Genen meist Zta, welches in den hier durchgeführten Versuchen nicht gleichzeitig eingesetzt wurde. IE1 und IE2 des HCMV wirken überwiegend über SP1, welches ebenfalls im *TRE2*-Promotor keine signifikante Bindestelle aufzeigte.

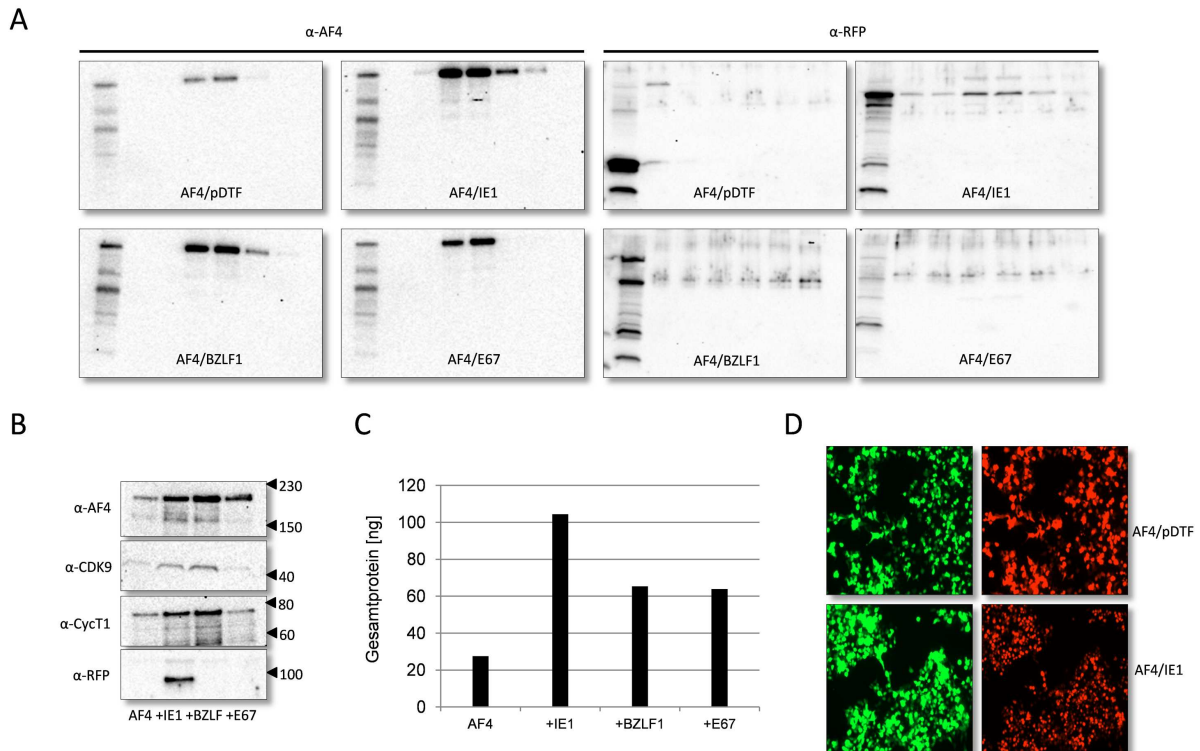


Abbildung 3.7.2. Stabilisierung des AF4-MPCs in Anwesenheit viraler IE Proteine. (A) Western-Blot Analyse von aus induzierten TCZP-AF4ST Zellen aufgereinigter AF4ST MPCs 48 Stunden nach der transienten Transfektion eines Leervektors (pDTF) oder Expressionsplasmiden für RFP-markiertes HCMV IE1, EBV BZLF1 oder HPV16 E6/7. Aufgetragen sind von links nach rechts ein Aliquot des eingesetzten Gesamtzelllysats (0,2%) sowie die Eluatfraktionen 1-6 (je 10%). Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern für AF4 (links) oder RFP (rechts). (B) Western-Blot Analyse der vereinigten Eluatfraktionen 2-5 der in (A) beschriebenen AF4-MPCs. Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern. Der proportionale Anstieg an CDK9 und CycT1 des P-TEFb mit der AF4 Menge ist sichtbar, weiterhin kann das RFP-markierte IE1 deutlich in dem vereinigten Eluat detektiert werden. (C) Repräsentative Auftragung der erhaltenen Gesamtproteinmenge aus den in (A) beschriebenen, aufgereinigten AF4 MPCs in Nanogramm. Die Erhöhung der Expression des AF4 und der gebildeten AF4 MPCs erhöht entsprechend die Menge an aufgereinigtem Protein. (D) *in vitro* GFP/RFP-Fluoreszenzmikroskopie der in (A) beschriebenen, induzierten und transfizierten TCZP-AF4ST Zellen (100-fach vergrößert, repräsentativer Bildausschnitt, Belichtung GFP 0,5 s, RFP 1 s).

Die bisherigen Ergebnisse legen einen grundsätzlichen Mechanismus in der Verwendung des AF4 durch die IE Proteine des HCMV und des EBV nahe. Trotzdem konnte in den Affinitätsaufreinigungen das Zta Protein nicht identifiziert werden. Wie bereits in Kapitel 3.3. dargestellt ist die Methode der Reinigung entscheidend, um eine vollständige Aussage über die Bindung von Proteinen an den AF4 MPC zu treffen. Weiterhin waren die eingesetzten IE

Proteine über ihren C-Terminus mit einem RFP fusioniert, was zu einer Verfälschung der Interaktionsdaten führen könnte. Um diese Interaktion also näher zu untersuchen, wurden Expressionsplasmide für Flag-markiertes IE1, IE2, Zta oder Rta sowie AF4ST transient in 293T Zellen transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion über das Flag-Epitop die viralen IE Proteine immunpräzipitiert. Die Analyse der Immunpräzipitationen durch Western-Blot bestätigte die Interaktion zwischen AF4 und IE1 deutlich, zeigte aber ebenfalls eine klare Interaktion mit dem HCMV IE2 und darüber hinaus eine detektierbare Interaktionen zwischen AF4 und beiden EBV Proteinen Zta und Rta, auch wenn die Effizienz der Immunpräzipitation trotz deutlicher Expression beider Proteine nur gering war (Abbildung 3.7.3. A). Aufgrund der schwachen Signale in diesem Versuch und der ausbleibenden Detektion in der MPC Reinigung kann vermutet werden, dass die Interaktion zwischen AF4 und Zta/Rta durch Wechselwirkung C-terminaler Bereiche vermittelt wird, welche die gleichzeitige Aufreinigung verhindert. Die Interaktion zwischen AF4 und IE1/IE2 wird dementsprechend vermutlich über den N-Terminus des AF4 vermittelt, so konnte in Immunpräzipitationen durch den AF4-spezifischen Antikörper mit N-terminalem Epitop die Interaktion analog zu Kapitel 3.3. nicht gezeigt werden (nicht gezeigt). Das Vorhandensein distinkter Interaktionsdomänen für IE1/IE2 und Zta/Rta könnte ein Grund für den unterschiedlich ausgeprägten funktionellen Effekt der Proteine sein.

Eine weitere Auffälligkeit in diesen Ergebnissen ist die detektierte Größe des Rta Proteins. Trotz eines kalkulierten Molekulargewichts von 68,8 kDa wird das Protein unter Verwendung eines Flag-spezifischen Antikörpers ähnlich dem Zta bei rund 50 kDa detektiert. Der Expressionsvektor wurde durch mehrfachen Restriktionsverdau und Sequenzierung geprüft und enthält die korrekte CDS des BRLF1, nicht die des BZLF1. Weiterhin sind die funktionellen Auswirkungen durch Verwendung dieses Vektors ähnlich aber distinkt zu dem des Zta Proteins. Die Ursache für das Auftreten der apparenten Größe konnte in dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden. Es ist möglich, dass es aufgrund der verwendeten CDS zum Spleißen der mRNA kommt und so ein verkürztes Rta entsteht. Alternativ ist es möglich, dass es sich - sehr ähnlich zum AF4 Protein - um ein besonderes Laufverhalten in der SDS-PAGE handelt.

Um einen physiologisch relevanten Kontext der Interaktion zwischen IE1 und AF4 mehr zu vertiefen, wurde der Effekt der Kooperation beider Proteine auf die Aktivität des *ALOX5* Genkörpers bestimmt. Dazu wurden Expressionsplasmide für AF4ST und IE1 oder ein Leervektor transient in 293T Zellen transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion über Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) und anschließender quantitativer PCR der Stand der generellen Histon 3 Acetylierung als transkriptionell aktive, epigenetische Modifikation bestimmt. Dabei wurden drei Abschnitte des *ALOX5* Genkörpers untersucht: der Promotor

für die Transkriptionsinitiation, das Intron 1 für die arretierte Elongation und das letzte Intron 13 für die produktive Elongation. Eine Relation auf die Leervektor-Kontrollen zeigt eine gleichmäßige, drei- bis vierfache und signifikante Erhöhung der Acetylierung des Histon 3 über den gesamten Genkörper nach Überexpression von AF4ST (Abbildung 3.7.3. B). Damit wird die transkriptionell aktivierende Wirkung des AF4 unterstrichen, wobei in diesem Fall die Aktivierung nicht nur spezifisch für Elongationsprozesse gilt, sondern den gesamten Genkörper inklusive Promotor umfasst. Eine Co-Transfektion mit IE1 führt zu einer sichtbaren Repression dieses Effektes. So sinkt der Status der Acetylierung am Histon 3 z.T. signifikant auf ein Niveau nahe der Leervektor-Kontrolle ab, im Falle des Intron 13 sogar leicht darunter. Ob die Repression tatsächlich durch Inhibierung der AF4-vermittelten Effekte, entweder direkt oder durch kompetitive Rekrutierung des AF4 MPC, oder AF4-unabhängig bzw. dominant gegenüber der Aktivierung durch AF4 ist, bleibt zu untersuchen.

Abschließend sollte die Interaktion zwischen IE1 und AF4 in einem anderem, physiologisch authentischeren Zellsystem untersucht werden. Dazu erfolgte die transiente Transfektion von Expressionsplasmiden für AF4ST, IE1 oder einem Leervektor in humane Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19). Diese sind beschriebene Ziele des HCMV in der Primärfektion⁵⁶⁸ und sollten daher ebenfalls die in 293T Zellen gezeigten, induktiven Effekte gegenüber AF4 zeigen. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, DAPI-gefärbt und immun-histochemisch durch spezifische, Fluoreszenz-markierte Antikörper für AF4 oder der 5-LO markiert. Durch anschließende *in-vitro* Fluoreszenzmikroskopie gegenüber den markierten Antikörpern konnte sowohl der induktive Effekt der IE1 Transfektion gegenüber der 5-LO als auch gegenüber AF4 bestätigt werden (Abbildung 3.7.3. C, weiße Pfeile).

3. Ergebnisse

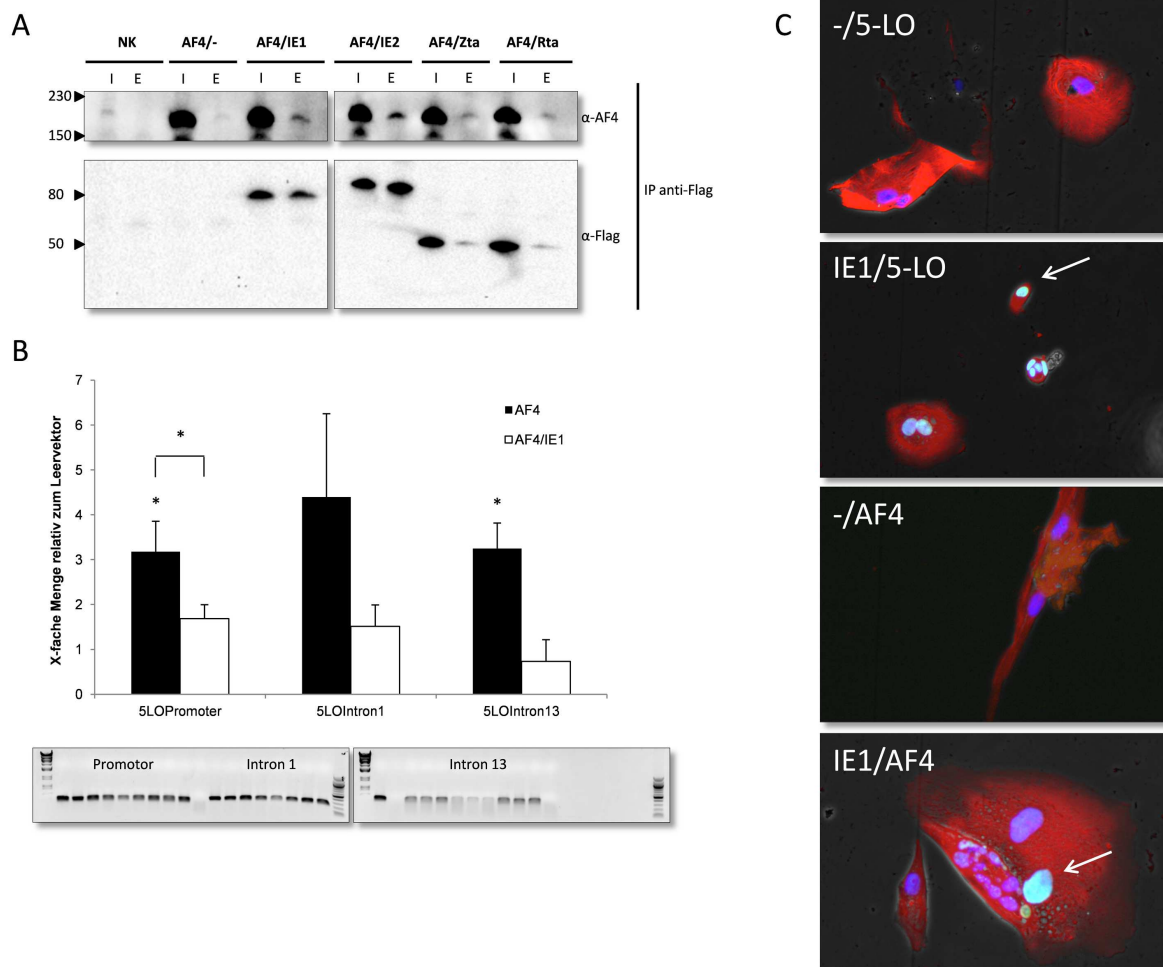


Abbildung 3.7.3. Funktionelle Interaktion zwischen AF4 und viralen IE Proteinen. (A) Western-Blot Analyse der Immunpräzipitation von Flag-markierten IE Proteinen HCMV IE1, IE2 und EBV Zta und Rta. 293T Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für AF4ST, den viralen Proteinen oder einem Leervektor (NK) transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion geerntet. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem Flag-spezifischen Antikörper aus normierten Kernfraktionen. Gezeigt sind je ein Aliquot der eingesetzten Kernfraktion (2%) und der Eluat-Fraktion (33%). Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen, spezifischen Antikörpern. (B) Oben: Ergebnisse der Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) auf den Zustand der Histon 3 Acetylierung im *ALOX5* Genkörper in Abhängigkeit von AF4ST und HCMV IE1. 293T Zellen wurden transient mit einem Leervektor bzw. Expressionsplasmiden für AF4ST bzw. HCMV IE1 transfiziert, nach 48 Stunden geerntet und der ChIP durchgeführt. Die Analyse der co-Immünpräzipitierten DNA in den Genfragmenten (Promotor, Intron 1 und Intron 13) wurde mittels qPCR erstellt und ist relativ zur Transfektion mit dem Leervektor aufgetragen [+S.E.M., *= $p < 0,05$]. Unten: Kontrolle homogener und distinkter Amplifikate korrekter Größe aus der qPCR durch 1,5%ige Agarosegelelektrophorese. Aufgetragen ist je eine Probe aus den Triplikaten. (C) *in vitro* GFP/DAPI/RFP-Fluoreszenzmikroskopie zur Kontrolle der induktiven Effekte des IE1 gegenüber AF4 und der 5-LO in ARPE-19 Zellen. Die Zellen wurden dazu transient mit Expressionsplasmiden für AF4ST, HCMV IE1, 5-LO sowie einem Leervektor transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion fixiert und DAPI-gefärbt. Die fixierten Zellen wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen AF4 und 5-LO inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop dokumentiert (200-fach vergrößert, repräsentativer Bildausschnitt, Belichtung GFP 0,5 s, RFP 1 s, DAPI 0,2 s. Zur besseren Visualisierung der Lokalisation wurden die Bilder der Einzelkanäle zusammengelegt). Die Detektion des AF4 bzw. der 5-LO mittels der markierten Antikörper erfolgt nur bei gleichzeitiger Expression des IE1.

4. Diskussion

4.1. Interaktion und Aktivierung zwischen AF4 und P-TEFb

Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb) ist der entscheidende, regulative Proteinkomplex in der Transition einer arretierten RNAP II zur produktiven Elongation. Dabei phosphoryliert der CyclinT1/CDK9-Komplex die CTD der RNAP II sowie die negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF und ermöglicht so die Rekrutierung weiterer prozessierender Faktoren an die aktivierte CTD und eine Dissoziation der negativen Faktoren (siehe Kapitel 2.1.7.). Ohne diese aktivierenden Einflüsse kann die RNAP II im Falle elongationskontrollierter Gene keine prä-mRNA synthetisieren und die betroffenen Gene können in der Zelle nicht exprimiert werden. Aufgrund dieser zentralen Rolle des P-TEFb Komplexes und der Kontext-abhängigen Induktion von Genexpressionsprogrammen ist es notwendig, dass P-TEFb streng reguliert wird und es einerseits nicht zu einer übermäßigen Aktivierung ungewollter Genexpression und andererseits nicht zu einer Repression dieses Faktors im Bedarfsfall kommt. Während für die direkte, post-translationale Modifizierung der P-TEFb Untereinheiten CDK9 und CyclinT1 bereits wichtige Erkenntnisse über regulativ wirksame Seitenketten gewonnen wurden, ist der Mechanismus der Rekrutierung des P-TEFb nur unzureichend untersucht. Nachdem bekannt wurde, dass inaktives P-TEFb nicht als freies Dimer in der Zelle vorliegt, sondern in größeren RNA/Protein-Speicherkomplexen (7SK snRNPs) gebunden wird³⁶¹⁻³⁶⁵, war klar, dass Mechanismen zur Rekrutierung des P-TEFb aus den Speicherkomplexen existieren müssten. Ein freies Dissoziieren des P-TEFb aus diesen Komplexen im Sinne eines zellulären Gleichgewichtes erschien nicht als wahrscheinlich, da in diesem Fall eine stringente Regulation nicht gewährleistet würde. Die Rolle der Rekrutierung wurde bisher dem Bromodomänen-enthaltenen Protein BRD4 zugeschrieben³⁷⁹, welches ursprünglich als Chromatin-bindendes Protein beschrieben wurde^{377,378} und dessen Anwesenheit nicht als generelles Ereignis in der Transkriptionselongation identifiziert war⁴⁷⁹. Weiterhin erscheint die Rolle des BRD4 bivalent, denn es besitzt eine P-TEFb-unabhängige Kinaseaktivität für die RNAP II CTD, kooperiert jedoch nicht mit Tat, vermindert eher die Aktivität von P-TEFb und scheint für die Induktion einer Reihe von Genen nicht benötigt zu werden^{379,478,479}. Daher wurde die Vermutung laut, dass BRD4 eher für die basale Transkription notwendig ist und SEC-abhängige Prozesse nicht auf dessen Aktivität beruhen. Damit eröffnete sich die Frage nach einem anderen rekrutierenden Faktor. Während die einzelnen Komponenten der SECs funktionell durchaus charakterisiert wurden, war über die direkte Funktion der Mitglieder der *AF4/FMR2*-Familie wenig bekannt, obwohl sie als wesentliche Faktoren der SECs identifiziert worden waren.

Bereits in den Vorarbeiten dieser Arbeit konnte durch stringente Affinitätsaufreinigung gezeigt werden, dass AF4 Teil eines funktionellen Multiproteinkomplexes ist, der als AF4 MPC bezeichnet wurde. Interessanterweise wurden CDK9, CyclinT1 und HEXIM1, nicht jedoch LARP7 oder MEPCE als Teil dieses AF4 MPC identifiziert. Weiterhin konnte durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente gezeigt werden, dass dieser Komplex an Lysinresten acetyliertes CDK9 enthält. Zudem führte eine Überexpression von AF4 zu einer vermehrten Menge an HEXIM1, was als "negativer *feed-back loop*" für hyperaktives P-TEFb bereits beschrieben worden war. Zusätzlich konnte AF4 ein HIV-1 TAR-kontrolliertes Expressionssystem aktivieren, welches obligat von der Tat-abhängigen Transition der arretierten RNAP II zur elongierenden Form abhängig ist⁴⁸⁶. Es lag damit nahe zu vermuten, dass AF4 ein direkter Regulator von P-TEFb ist und zwar im Sinne einer rekrutierenden und aktivierenden Funktion. Dass auch HEXIM1 im AF4 MPC identifiziert wurde deutet darauf hin, dass AF4 entscheidend an der direkten Dissoziation des 7SK snRNP beteiligt ist und nicht nur einen P-TEFb bindenden Faktor darstellt. Eine weitere, bedeutende Erkenntnis war die Tatsache, dass der t(4;11)-assoziierte AF4-MLL MPC analoge, aber stärker ausgeprägte Effekte gegenüber P-TEFb zeigte. Da AF4-MLL nur den N-terminalen Teil des AF4-Proteins enthält, scheint diese Region des Proteins eine entscheidende Funktion in der Vermittlung dieser Effekte zu haben. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass in den Vorversuchen das reziproke AF4-MLL nicht gleichzeitig mit MLL-AF4 untersucht wurde, so dass eine Beteiligung der nur C-terminalen Region des AF4 keinen Einfluss auf diese Ergebnisse zeigen konnte. Da AF4-MLL als eine transdominant aktive Version des AF4 gesehen wird und die Bindung von CDK9 an AF4 vermutlich über den N-Terminus geschieht⁵⁴⁶, ist die höhere Potenz des AF4-MLL gegenüber P-TEFb erklärbar. Trotz dieser Erkenntnisse war ein genauer Einblick in die Wechselbeziehung zwischen AF4 und P-TEFb *bis dato* nicht gelungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Einfluss von AF4 auf die Transkription im Allgemeinen und auf P-TEFb im Speziellen untersucht werden. Dabei sollte auch überprüft werden, ob AF4 eine Rolle als "P-TEFb rekrutierender Faktor" einnehmen könnte. Dazu mussten zwei Zelllinien etabliert werden, welche zum Einen ein System zu reproduzierbaren und einfachen, induzierbaren Affinitätsaufreinigung des AF4 MPC unter verschiedenen Bedingungen ermöglichte (TCZP-AF4ST Zelllinie aus 293T Zellen) und zum Anderen ein AF4 Mangelsystem, in dem die Menge verfügbaren AF4 Proteins reduziert wird und so die Effekte des AF4 gegenüber der Transkription deutlich wurden (AF4kd V100 aus HeLa Zellen). Die Vorteile des induzierbaren Systems lagen dabei vor Allem in der Vermeidung des Einsatzes des Proteasom-Inhibitors MG132 und der Einsatz einer homogenen Zellpopulation. Induzierte TCZP-AF4ST Zellen zeigten in CCK-8 Messungen eine leicht erhöhte Wachstumsrate und eine verringerte, aber nicht aufgehobene, Kontakt- und

Teilungsinhibition mit einer Neigung zur Bildung von fluoreszenten Foci. Bei der Interpretation sollte jedoch berücksichtigt werden, dass CCK-8 Versuche auf der metabolischen Aktivität basieren und keine *bona fide* Proliferationstests sind und 293T Zellen weiterhin auch in nicht transfizierten Zustand in der Lage sind, über längere Inkubationszeiträume (10 Tage) in beschränktem Maße Foci zu bilden. Auf der anderen Seite war es nachvollziehbar, dass eine deregulierte bzw. dauerhaft aktive Transkription und damit mRNA und Proteinsynthese zum gleichzeitigen Anstieg der metabolischen Aktivität durch den gesteigerten Energiebedarf führt. Die AF4-abhängige Bildung von Foci ist ebenfalls beschrieben⁴⁸⁵. Die Affinitätsaufreinigung aus den TCZP-AF4ST Zellen führte reproduzierbar zu funktionellen, P-TEFb enthaltenden AF4 MPCs, wobei im Vergleich zu den Vorarbeiten die einzusetzende Menge an Zellen deutlich reduziert werden konnte.

Die Erstellung der stabilen AF4kd V100 Zelllinie wurde über das kommerzielle, lentivirale "MISSION® shRNA"-System der Firma Sigma-Aldrich erfolgreich durchgeführt. Aufgrund der Verwendung einer bereits durch die Firma validierten shRNA kam es nicht zu einer gleichzeitigen Verwendung einer unspezifischen Kontroll-shRNA ("*scramble*"). Da das Niveau an endogenem AF4 und damit im Besonderen ein durch *knock-down* reduziertes Niveau nicht im Western-Blot detektiert werden kann, wurde der Nachweis des *knock-down* durch einen hochsensiblen, AF4-spezifischen ELISA unter gleichzeitiger Kontrolle der mRNA Menge durch quantitative PCR durchgeführt. In beiden Fällen konnte die Herabsetzung des Protein- und mRNA-Niveaus reproduzierbar und signifikant festgestellt werden, wobei grundsätzlich eine steigende Verwendung an Virusüberstand (höhere MOI) und damit die steigende Menge transduzierter shRNA zu einem stärkeren *knock-down* führte. Die resultierende Zelllinie V100 zeigte eine Reduktion des AF4 Proteinniveaus auf ca. 40% im Vergleich zu unbehandelten HeLa Zellen. Der *knock-down* war über mehrere Passagen stabil und konnte auch nach dem Einfrieren und Auftauen der Zellen aus flüssigem Stickstoff festgestellt werden. CCK-8 Messungen zeigten eine ungefähr halbierte metabolische Aktivität und ein verlangsamtes Wachstum sowie kein Erreichen eines konfluenten Zellfilms, was analog zu den TCZP-AF4ST Zellen am reduzierten Energiebedarf der Zellen durch eine verminderte Transkription liegen kann. Eine morphologische Untersuchung zeigte verringertes Längenwachstum, eine "kauende" Morphologie der HeLa Zellen sowie mehr absterbende Zellen in Kultur, was auf erhöhten Zellstress hinweist. Einhergehend mit der zentralen Rolle des AF4 für die zelluläre Transkription zeigten sich die Zellen deutlich eingeschränkt lebensfähig und anfälliger für Zellstress. Welche Gene für diesen Phänotyp verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Es sei erwähnt, dass der NFκB-vermittelte zelluläre Schutz vor Apoptose von der Aktivität des P-TEFb abhängt⁷²⁹. Es kann daher spekuliert werden, dass AF4kd V100 Zellen *per se* anfälliger für die Apoptose sind, was die später gezeigte Induktion des NFκB im Falle des AF4 *knock-*

downs unterstrich. Es war in jedem Fall eindeutig, dass der *knock-down* eine negative Auswirkung auf die Zellen besitzt und das metabolische und wachstumsbezogene Verhalten zwischen TCZP-AF4ST und AF4kd V100 Zellen konträr war, wodurch diese Effekte auf die entsprechend enthaltene Menge an AF4 zurückzuführen waren.

Ein hier zu diskutierender Punkt in der gezeigten Methodik sind die unterschiedlichen Zelllinien, die verwendet wurden. Grundsätzlich sollte das System zur Vergleichbarkeit mit den Vorarbeiten in 293T Zellen etabliert werden, was im Falle der TCZP-AF4ST Linie erfolgreich war. Die Erstellung einer *knock-down* Zelllinie aus 293T Zellen war jedoch nicht möglich. Da die gezeigten Reporterexperimente bereits in HeLa Zellen etabliert waren, wurde daher auf die HeLa Zelllinie umgeschwenkt. Daher werden Vergleiche zwischen den Ergebnissen aus den unterschiedlichen Zelllinien grundsätzlich unter Vorbehalt getroffen bzw. die Ergebnisse vorrangig in Relation zu den Zelllinien-spezifischen Kontrollen diskutiert.

Eine Analyse von ausgewählten, Transkriptions-assoziierten Faktoren unter Einfluss des AF4 *knock-down* aus Gesamtzelllysaten der AF4kd V100 Zellen bestätigte den aktivierenden Einfluss des AF4 auf P-TEFb. CyclinT1 erfährt im endogenen Kontext keine Regulation auf Ebene der Proteinmenge, wird aber im Falle des *knock-down* schwächer exprimiert, wodurch die Menge an assoziiertem P-TEFb verringert werden kann. Während CDK9 keine messbare Veränderung in der Expression selbst zeigt, verschwindet die Phosphorylierung des Thr186 fast vollständig. Aufgrund der *bis dato* vorhandenen Erkenntnisse kann gefolgert werden, dass es sich bei dieser Modifikation tatsächlich um eine aktivierende Markierung handelt, da AF4 nachweislich zu einer Aktivierung des P-TEFb führte⁴⁸⁶. Ein weiterer repressiver Effekt des *knock-down* entstand gegenüber CDK2, deren detektierbares Proteinniveau deutlich absank. CDK2 aktiviert CDK7 durch Phosphorylierung und steuert damit einen entscheidenden Aktivator des P-TEFb als auch der CTD der RNAP II⁷³⁰. Der Verlust an CDK2 in der Zelle wies damit indirekt auf eine Inhibition des P-TEFb und der Aufrechterhaltung des Elongationsarrests hin. Es kann vermutet werden, dass AF4 eine induktive bzw. aktivierende Funktion gegenüber CDK2 vermittelt, um so die Bereitstellung des P-TEFb durch CDK7-vermittelte Unterbindung der Ausbildung von P-TEFb-BRD4 Komplexen der basalen Transkription zu erreichen. Gemessen an der relativen Menge des Actin kam es in den *knock-down* Zellen zu einer etwas stärkeren Expression von CDK7. Aufgrund der sinkenden Menge an AF4 und CDK2 kann dies als Gegenreaktion zur Aufrechterhaltung eines Reservoirs aktiver Kinase interpretiert werden. Dass die Expression des CDK7 direkt von AF4 repressiv reguliert ist, wird allerdings als wenig wahrscheinlich angesehen, insofern dass CDK7 als Teil des TFIIH zu den GTFs zählt und nicht nur speziell in der Elongation fungiert.

Abseits der CDKs führte der AF4 *knock-down* zu einer stärkeren Expression von NFκB sowie von MENIN. Beide Proteine wurden in der Folge als AF4 N-terminal assoziierte Faktoren identifiziert, p65 wurde bereits in den Vorarbeiten als Teil des AF4 MPC gefunden. Gleichzeitig sind der Tumorsuppressor MENIN und p65/RELA interessanterweise als Gegenspieler in ihrer transaktivierenden Funktion beschrieben⁷³¹. Eine Repression der MENIN Expression durch AF4 erscheint insofern sinnvoll, als dass MENIN über den MLL-Komplex die CDK-Inhibitoren p18 - und vor allem p27 - transkriptionell aktiviert und somit CDK2 inhibiert⁷³². Die Transkription von NFκB ist hingegen von P-TEFb abhängig⁷²⁹, von daher kann eine Inaktivierung des P-TEFb durch den Verlust funktioneller AF4-SECs eine potentiell ausgleichende Induktion der Expression des p50 als auch des p65 herbeiführen. Weiterhin interagiert BRD4 mit p65 im Sinne einer transkriptionellen Aktivierung⁷³³. Durch eine Verminderung der AF4 Menge können Faktoren wie RELA oder MENIN auch andere Funktionen übernehmen, wie z.B. eine Induktion der Transkription am *NFκB1* Gen. Inwiefern der AF4 MPC an solchen Prozessen beteiligt ist, bleibt abzuklären. Grundsätzlich würde ein solches Modell die Akkumulation der interagierenden Transkriptionsfaktoren erklären, als auch deren fehlende Lokalisation an ihren genomischen Wirkorten gleichzeitig auch die Signale zur Degradation bzw. Promotorrepression nach abgeschlossener induktiver Wirkung unterbindet.

Da CDK2, CDK7 und MENIN sowie das p50 des NFκB Transkriptionsfaktors als neue interagierende Faktoren mit dem AF4 MPC identifiziert wurden, sollte deren potentielle Inkorporation in den MPC geprüft werden. Dazu wurden sowohl der AF4 MPC als auch der AF4N MPC aufgereinigt und identisch zu den obigen Versuchen mit spezifischen Antikörpern auf die Anwesenheit der entsprechenden Faktoren getestet. Aus den Ergebnissen lassen sich zwei wichtige Aussagen ableiten. Zum Einen zeigte der aufgereinigte AF4 MPC wie bereits beschrieben die Interaktion mit P-TEFb und RELA, während weder p50 noch CDK2, CDK7 oder MENIN detektierbar waren. Analog zu den Vorarbeiten ist die Bindekapazität des AF4 daher eher gering, vergleicht man die Menge gereinigten AF4 gegenüber dem detektierbaren P-TEFb. Weiterhin war die Thr186-P Modifikation im AF4 MPC nicht erkennbar, auch wenn dies rein technisch an dem geringen Niveau des CDK9 liegen könnte. Betrachtet man vergleichend die Situation am AF4N MPC wird sowohl das breitere Interaktionsspektrum als auch die deutlich stärkere Assoziation mit den untersuchten Faktoren deutlich. So konnten trotz vergleichbarer Ausbeute in der Aufreinigung zusätzlich p50, CDK7 und MENIN identifiziert werden, CDK2 blieb weiterhin abwesend. Damit verfügt der AF4N-MPC sowohl über einen internen, P-TEFb regulierenden Faktor (CDK7) als auch über den vollständigen NFκB sowie einen weiteren Transkriptionsfaktor, MENIN. Zusätzlich war ein großer Teil des inkorporierten CDK9 mit der Thr186-P Modifikation versehen. Der AF4N MPC bildet damit eine zwar nicht physiologische aber in der t(4;11) induzierte,

bezüglich P-TEFb aktivierte Version des AF4 MPC. Dass CDK2 in beiden Komplexen nicht zu finden war, durch den *knock-down* jedoch in seiner Expression gemindert wird, deutete darauf hin, dass die regulativen Effekte des AF4/AF4N Proteins nicht lediglich auf Mitglieder des assemblierten MPC, also durch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, wirken, sondern vermutlich durch Kontrolle der Genexpression zustande kommen.

Wie das AF4N Protein seine potenteren Interaktionen zu den oben beschriebenen Faktoren vermittelt, ist noch völlig unklar. Neue Untersuchungen an AF5/AFF4 haben jedoch gezeigt, dass zum Einen dessen N-Terminus (NHD Domäne) analog an P-TEFb bindet und zum Anderen, dass jede eingegangene Protein-Protein Interaktion flexible Konformationsänderungen am Protein induzieren (*fold-on-demand*), welche zur SEC Assemblierung beitragen^{734,735}. Aufgrund der gemeinsamen NHD-Domäne sind die hier aufgezeigten Interaktionen mit P-TEFb an AF4 und AF4N nachvollziehbar. Dass diese Proteinfamilie eine höchst flexible, adaptive Protein-Konformation besitzt, die Kontext-abhängig modifiziert wird, wäre eine mögliche Erklärung für die erhöhte Bindekapazität des AF4N. Aufgrund der fehlenden C-terminalen Sequenzen könnte AF4N eine fixierte, P-TEFb bindende Konformation einnehmen, welche nicht durch Interaktionen mit anderen SEC Komponenten (ENL, AF9 etc.) gestört wird. Diese sind für Sequenzen abseits des N-Terminus beschrieben. Dass die Bindekapazität des AF4N in ihrer Potenz analog zu der des AF4-MLL war⁴⁸⁶, weist zusätzlich darauf hin, dass solche Konformationsänderungen sequenzspezifisch sind und nicht durch "fremde" Proteindomänen wie z.B. von denen des MLL induziert werden. Der N-Terminus des AF4 könnte damit auch im AF4-MLL seine fixierte, P-TEFb-affine Konformation einnehmen. Inwiefern die Bindung des AF4-MLL an andere, AF4-assoziierte Faktoren wie BRD4 oder DOT1 in einem solchen Fall hergestellt wird und wie die funktionellen Konsequenzen gegenüber P-TEFb sind, bleibt zu klären. Es ist möglich, dass die P-TEFb affine Konformation ebenfalls die Homodimerisierung mit AF4 unterstützt (so wurde in den Vorarbeiten auch AF4 im AF4-MLL MPC identifiziert) und abseits der Bindung von P-TEFb so eine Interaktionsplattform zu solchen Faktoren geschaffen wird. Weiterhin ist ein sequentielles Modell möglich, das eine abwechselnde/aufeinanderfolgende Bindung zeigt. So könnte der AF4 N-Terminus vorrangig der Bindung von P-TEFb dienen, aber nach der Transition der arretierten RNAP II zur produktiv elongierenden Form für weitere Elongations-assoziierte Interaktionen wie mit DOT1/CARM1 zur begleitenden Etablierung epigenetischer Signaturen eingesetzt werden.

Um auch hier nachzuweisen, dass die Bindung spezifisch für den N-Terminus des AF4 ist, wurde ein kompetitiver Versuch durchgeführt. Die Immunpräzipitation des AF4 und auch AF4N durch einen spezifischen, kommerziellen Antikörper, der als Epitop den N-Terminus des AF4 erkennt und in der Folge bindet, müsste gemäß obiger Annahme zum

Bindungsverlust führen. Zum Einen kommt es zu einer rein sterischen Konkurrenz zwischen dem anspruchsvollen Antikörperprotein und AF4-Bindungsfaktoren, zum Anderen müsste selbst bei einem nicht-überlappenden Bindungsmotiv die Bindung des Antikörpers die Ausbildung der affinen Konformation blockieren. Der Bindungsverlust konnte tatsächlich deutlich gezeigt werden, in beiden Fällen kommt es trotz erfolgreicher Präzipitation des AF4/AF4N zur Detektion von keinem der bekannten Bindepartner. Wie beschrieben handelt es sich bei den Signalen in der p65/p50-Spur um eine Kreuzreaktion mit dem eingesetzten Antikörper. Damit wurde gezeigt, dass der N-Terminus des AF4 die entscheidende Bindungsdomäne für P-TEFb und weitere Transkriptions-assoziierte Faktoren ist.

Da sowohl AF4 als auch AF4N eine P-TEFb Bindung zeigten, wurde eine mögliche Konkurrenz beider Proteine, die im Falle der t(4;11)-Translokation gleichzeitig existieren, untersucht. Dazu wurde N-terminal BFP-markiertes CycT1 zusammen mit AF4, AF4N oder einer Kombination beider transient in 293T Zellen transfiziert und immunpräzipitiert. Sowohl AF4 als auch AF4N wurden über BFP-CycT1 als auch endogenes CycT1 co-immunpräzipitiert. Im Falle der Konkurrenzsituation war die jeweilige Co-Präzipitation ebenfalls zu beobachten, auch wenn im direkten Vergleich ein leichtes Favorisieren für AF4 bzw. eine Reduktion der AF4N Co-Präzipitation erkennbar war. Nichtsdestotrotz war keine obligate Konkurrenz erkennbar. Dies war für die Pathogenese einer t(4;11)-Translokation insofern eine wichtige Erkenntnis, als dass endogenes AF4 in der transformierten Zelle parallel zu AF4-MLL immer noch funktionell aktiv sein kann. Die gleichzeitige, fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der transfizierten Zellen zeigte darüber hinaus sogar kooperative Effekte beider Proteine. Im Vergleich zu einer alleinigen Transfektion von BFP-CycT1 zeigte die Ko-Transfektion mit AF4 und AF4N eine stärkere Expression des BFP-CycT1, was mit den *knock-down* Daten korreliert, sowie eine diffusere und punktierte Verteilung im Zellkern. Diese Effekte werden später ausführlich diskutiert.

4.2. CDK9-Acetylierung durch AF4 und Abhängigkeit von HDACs

In den Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das in den AF4 MPC aufgenommene CDK9 an seinen Lysinresten acetyliert ist⁴⁸⁶. Es wurde in den vorangegangenen Untersuchungen jedoch nicht geklärt, welcher oder welche der vorhandenen Lysinreste post-translational modifiziert wird. Da mehrere Seitenketten des Proteins als Ziele einer funktionellen Acetylierung durch p300 oder GCN5/PCAF beschrieben waren^{432,433}, wurde zunächst untersucht, welche dieser Reste in Anwesenheit des AF4 genau acetyliert werden. Dazu wurden durch zielgerichtete Mutagenese Alanin- und Arginin-Mutanten der Lysine K44 sowie K48/K49 erstellt und auf deren Acetylierungsstatus überprüft. Die Wahl eines Alanin und eines Arginin in der Mutagenese sollte zwischen zwei Formen der potentiellen Inaktivierung

des CDK9 unterscheiden. Eine Arginin-Mutante (basische Seitenkette) der K48/K49 Lysine sollte durch die hohe sterische und elektrochemische Analogie zu dem endogenen Lysin die Fähigkeit der Interaktion mit der ATP-Bindetasche aufrecht erhalten und somit funktionell nur durch die fehlende Möglichkeit der Acetylierung beeinflusst werden. Die Alanin-Mutante (nicht-basische Seitenkette) sollte aufgrund des Verlust der positiven Ladung in ϵ -Position und der verkürzten Seitenkette nicht mehr als essentieller Bestandteil der ATP-Bindetasche fungieren können und somit eine ATP-Bindung unmöglich machen. Obwohl eine solche Funktion für K44 nicht beschrieben war, wurde zum genauen Vergleich analoge Mutanten erstellt (K44A, K44R). Alle Mutanten, sowie nicht mutiertes, Flag-markiertes CDK9, wurden in 293T Zellen gleichmäßig exprimiert und in korrekter Größe in der Kernfraktion detektiert. Damit standen sie grundsätzlich für die Verwendung in SECs oder AF4 MPCs zur Verfügung.

Eine gleichzeitige Co-Transfektion mit AF4ST und die folgende Immunpräzipitation der Flag-markierten Proteine über einen Flag-spezifischen Antikörper zeigte eine verstärkte, AF4-abhängige Lysin-Acetylierung am CDK9 im Vergleich zu allen eingesetzten Mutanten. Damit ist die starke Acetylierung des CDK9 im AF4 MPC, welche bereits im Vorfeld gezeigt wurde, direkt durch AF4 induziert. AF4 rekrutiert damit nicht lediglich bereits acetyliertes CDK9 in den MPC, sondern induziert auch dessen Bereitstellung. Diese Reaktion benötigte jedoch die Anwesenheit aller drei Lysine K44, K48 und K49. Der genaue Mechanismus dieser Modifikation bleibt aufzuklären, aber AF4 hat selbst keine enzymatische Funktion im Sinne einer Acetyltransferase und im Gegensatz zum AF4-MLL MPC auch keine Komplexpartner wie CREBBP/p300. Eine Interaktion mit dem MLL-Komplex ist zwar denkbar, der Nachweis steht aber noch aus. Dieses Ergebnis war jedoch erneut ein unterstützender Erkenntnis für die potente onkogene Funktion des AF4-MLL, welches über seinen C-terminalen MLL-Teil und die TAD-Domäne selbstständig CREBBP/p300 binden kann und somit CDK9 parallel zu dessen Rekrutierung *in cis* aktivieren könnte.

Eine distinkte Acetylierung konnte mit keiner Mutante, unabhängig von der Substitution zu Alanin oder Arginin, detektiert werden. Dies führte zu zwei Schlussfolgerungen. Zum Einen war die Funktionalität der ATP-Bindetasche bzw. die ATP-Bindung für den Acetylierungsstatus der CDK9 nicht relevant. Zum Anderen muss eine bisher nicht aufgeklärte Wechselwirkung zwischen dem Acetylierungsstatus dieser Lysine stattfinden. Dies wird auch in den Ergebnissen von Sabo *et al.* deutlich, in deren Untersuchung nur die Doppelmutante K44R, K48R einen tatsächlich vollständigen Verlust der Acetylierung zeigte⁴³³. Um nähere Informationen über diese Wechselwirkung zu erhalten und um eine vermutete Rolle der HDAC8 in der Regulation der CDK9 Acetylierung zu untersuchen, wurden CDK9 als auch beide Alanin-Mutanten in Anwesenheit von zwei HDAC-Inhibitoren

(TSA, Klasse I/II Pan-HDAC-Inhibitor und SB-379278A, spezifischer HDAC-8-Inhibitor (Klasse I)) exprimiert. Während in mit Leervektor transfizierten Zellen erwartungsgemäß ein deutlicher Anstieg der Acetylierung des CDK9 im Falle der Zugabe von TSA sichtbar war, zeigte auch die Verwendung von SB-379278A einen leichten Anstieg.

Die Expression der CDK9 Mutanten zeigte hingegen ein völlig anderes Ergebnis. Eine Überexpression der K44A Mutante führte zu einer starken Reduktion der Lysin-Acetylierung durch Einsatz von TSA, während die K48/K49A-Mutante völlig unbeeinflusst blieb. Der Einfluss von SB-379278A blieb hingegen in jedem Fall unverändert. Diese Effekte kamen nicht durch eine HDACi-vermittelte Beeinflussung des Proteinniveaus des CDK9 zustande. Da TSA seine inhibierende Wirkung nur gegen Klasse I/II-HDACs zeigt, lässt sich schlussfolgern, dass gemäß den Daten der K44A-Mutante die Deacetylierung der Lysine 48 und 49 über Sirtuine (oder HDAC11 als einzige Klasse IV-HDAC) abläuft. Weiterhin ist eine Deacetylierung (oder wie hier gezeigt die Abwesenheit) dieser Lysine notwendig, um eine Acetylierung des Lysin 44 einzuleiten, welches wiederum durch die TSA-sensitive HDAC3 deacetyliert werden kann. Die invarianten Effekte des SB-379278A sind möglicherweise unspezifisch und auf die hohe eingesetzte Konzentration rückzuführen. Effekte stellten sich erst ab einer Konzentration von 50 μM im Kulturmedium ein, während ein *in-vitro* Inhibitor-Screening an bakterieller HDAC8 ein IC_{50} von 500 nM zeigte⁷³⁶. Da HDAC8 eine Klasse I-HDAC ist, sollte sie durch TSA ebenfalls inhibiert werden und analoge Effekte zu der Behandlung mit TSA zeigen. Dies gilt nicht für die Expression des CDK9 bzw. der K44A-Mutante. Es ist dabei jedoch nicht auszuschließen, dass grundsätzlich weitere Seitenketten des CDK9 acetyliert vorliegen und über HDAC8 deacetyliert werden können.

4.3. Rekrutierung von P-TEFb

Aufgrund der bis hier präsentierten Ergebnisse wird deutlich, dass AF4 bzw. dessen N-Terminus eine aktivierende Wirkung auf den P-TEFb hat. Sie binden sowohl CDK9 als auch CyclinT1, nicht aber LARP7, und induzieren eine aktivierende Acetylierung von CDK9, was zu einer verstärkten Phosphorylierung der RNAP II CTD und der Aktivierung eines Elongations-basierten Versuchssystems führte. Gleichzeitig waren regulativ aktivierende Effekte gegenüber P-TEFb-assoziierten Faktoren wie CDK7 und CDK2 sichtbar. Es stellte sich daher auch vor dem Hintergrund der nicht generellen Rolle des BRD4, bzw. dessen Anwesenheit im AF4 MPC, die Frage, ob AF4 *per se* ein rekrutierender Faktor von P-TEFb ist. Um dies zu untersuchen, wurden sowohl zellfreie als auch zellbasierte Versuche durchgeführt, die eine Dissoziation des P-TEFb von LARP7 anzeigen sollten. LARP7 selbst ist fest mit der 7SK snRNA und nur transient mit CycT1 verbunden^{372,373}. Die Transition in den Speicherkomplex wird zwar primär durch HEXIM1 vermittelt^{364,369}, da dieses jedoch als

Komponente des AF4 MPCs identifiziert werden konnte⁴⁸⁶, ist die Existenz von P-TEFb-HEXIM-AF4 Übergangszuständen vorstellbar. Dies disqualifizierte die Interaktion mit HEXIM1 als optimalen Indikator für eine Integration in die Speicherkomplexe.

Eingangs wurde mit Absicht ein komplexes System gewählt, um den Rekrutierungsprozess aufzuzeigen. So wurden getrennt CDK9 und AF4ST, HCMV IE1 oder 5-LO in 293T Zellen überexprimiert und erst nach der Erstellung von normierten Gesamtzelllysaten diese Faktoren durch Vereinigung der Lysate kombiniert. Dieses System gewährleistete zum Einen die Anwesenheit aller beteiligten - auch stark transienten - Faktoren in der Reaktion und zum Anderen führt die getrennte Expression zur Vermeidung von Ungleichgewichten, die durch eine unterschiedliche Expressionskinetik entstehen könnten. So könnte durch getrennte Expression in den CDK9-exprimierenden Zellen ein Reservoir an Speicherkomplexen/P-TEFb entstehen und im anderen Fall der AF4 MPC ohne Störung durch die Präsenz eines CDK9/P-TEFb Überschusses, der eine Vorsättigung des Systems bedeuten könnte, assembliert werden. Weiterhin ist die Verwendung von CDK9 als zu exprimierendem Faktor aus zwei Gründen dem CyclinT1 vorzuziehen. Erstens bildet CDK9 keine direkten Kontakte zu LARP7 aus, wodurch unspezifische Interaktion vermieden wird, und zweitens ist CDK9 bereits im endogenen Kontext der variable Faktor bei der Bildung des P-TEFb, während CyclinT1 in seinem Proteinniveau relativ konstant ist. Die Errichtung eines stärkeren Angebots an CDK9 und eine folgende Bildung von funktionellem P-TEFb ist damit ein zelleigener Prozess und deshalb weniger artifiziell.

Tatsächlich führte die Kombination beider Lysate und die folgende Immunpräzipitation des CDK9 zu einem Verlust an detektierbarem LARP7 im Falle einer Überexpression von AF4ST. Gleiche Ergebnisse konnten auch mit dem IE1 Protein des HCMV erzielt werden. Dies galt nicht für die Expression eines Leervektors oder eines Kontrollproteins, wie z.B. der 5-LO. Damit konnten zum Einen eine unspezifische Aktivierung des P-TEFb durch Transfektion der Zellen oder die Expression eines beliebigen Konstrukts ausgeschlossen werden. Zum Anderen zeigte die völlige Abwesenheit des LARP7 in den Präzipitaten, dass nicht die Speicherkomplexe an sich, sondern nur das dort enthaltene P-TEFb rekrutiert wurde.

Um das System feiner aufzulösen wurde in ein zellfreies System gewechselt. Dazu wurden über Flag-markiertes CDK9 aus 293T Zellen Speicherkomplexe aufgereinigt und damit aus den Zellen isoliert und mit rekombinanten, GST-markierten Proteinen (GST-AF4N, GST-HEXIM1) inkubiert. Als Positivkontrolle für eine Auflösung der Speicherkomplexe diente RNase, die durch den Abbau der 7SK snRNA die Speicherkomplexe vollständig auflöste. Nach Inkubation wurden das Matrix-gebundene CDK9 (P-TEFb) von den Überständen getrennt (Speicherkomplexe). Die Analyse dieser beiden Fraktionen im Western-Blot zeigte,

dass RNase zur physischen Dissoziation von P-TEFb aus den Speicherkomplexen führt, während LARP7 nur in der Überstandfraktion nachzuweisen war. GST-AF4N und GST-HEXIM1 konnten dies erwartungsgemäß nicht, da zusätzliches HEXIM1 nicht in die Speicherkomplexe inkorporiert werden kann. Die Entdeckung, dass das rekombinante GST-AF4N nicht in der Lage war, P-TEFb von dem Speicherkomplex zu trennen, deutete klar darauf hin, dass weitere Faktoren dafür notwendig sind. Es gibt dafür eine Reihe von potentiellen Kandidaten. So wurde BRD4 als Komponente des AF4 MPC gefunden, was ein Modell befürwortet, in dem dieser MPC über AF4 an die Speicherkomplexe bindet und BRD4 abseits der SECs die aktive Rekrutierung vornimmt. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass hier nur der N-Terminus des AF4 eingesetzt wurde. Vor allem in Hinblick auf die gedacht flexible Konformation der *AF4/FMR2*-Familienmitglieder könnte zwar der N-Terminus ausreichend für die Bindung an P-TEFb sein (s.o.), die Herauslösung aus dem Speicherkomplex jedoch einen Bindungs-induzierte Konformationswechsel benötigen, der z.B. unterstützende Faktoren wie BRD4 proximal zu P-TEFb oder der 7SK snRNA platziert. Dieser Wechsel benötigt vermutlich weiter C-terminal liegenden Sequenzen des AF4. Es sollte hierbei berücksichtigt werden, dass die Produktion eines vollständigen, rekombinanten AF4 aufgrund der Größe des Proteins nicht zu bewerkstelligen war. Der sukzessive Einsatz anderer, ergänzender rekombinanter Fragmente des AF4 kann hingegen das Problem einer bedingenden Konformation nicht lösen. Es wurde hier weiterhin bewusst kein affinitätsgereinigter AF4/AF4NST MPC eingesetzt, da in diesen bereits P-TEFb vorliegt und damit a) eine weitere Rekrutierung vermutlich nicht oder nur eingeschränkt vollzogen wird und b) die Verhältnisse eingesetzter Faktoren (P-TEFb/HEXIM1) nicht mehr vergleichbar zu den Kontrollen sind. Das die Präsenz der N-terminal fusionierten GST-Markierung eine artifizielle Blockade für die bindende Funktion des AF4N darstellt, konnte hingegen durch die folgenden Versuche ausgeräumt werden.

Der eben beschriebene Versuch wurde analog mit der Überexpression von zwei in ihrer Aktivität modifizierten Varianten des CDK9, nämlich CDK9T186A (inaktiviert) und K48A/K49A (aktiviert), durchgeführt. Hier sollte die Sensitivität der Ausbildung der Speicherkomplexe gegenüber funktionellen Modifikation des CDK9 getestet werden. Beide Varianten des CDK9 zeigten weder in der Matrixfraktion noch in der Überstandfraktion detektierbares LARP7, was darauf hinweist, dass sie nicht in Speicherkomplexe eingebunden werden. Damit konnte gezeigt werden, dass eine korrekte post-translationale Modifikation von CDK9 essentiell dafür ist, dass P-TEFb in die Speicherkomplexe aufgenommen wird. Dass die aktivierte Variante K48A/K49A keine Assoziation mit LARP7 zeigte wies darauf hin, dass die inaktivierende Acetylierung dieser Lysine eine Rolle in der Bindung an HEXIM1 spielt. Vermutlich kann diese Bindung nur mit einer blockierten ATP-Bindetasche induziert werden, um die ungewollte Blockade aktivem P-TEFbs bzw. die

fälschliche Bindung von ATP an inaktive Komplexe zu unterbinden. Die T186A Variante des CDK9 ist zwar dauerhaft inaktiv und sollte daher in den Speicherkomplexen vermutet werden. Da jedoch die Interaktion mit CyclinT1 einen Phosphorylierung ebendieser Seitenkette induziert, ist es möglich, dass diese Mutante zwar CyclinT1 bindet (wie in dieser Arbeit gezeigt), aber niemals funktionell aktiviert wird. Inwiefern dies ein Hinweis darauf ist, dass P-TEFb erst nach Durchführung seiner enzymatischen Aktivität in die Speicherkomplexe integriert wird, bleibt aufzuklären. Im Sinne einer ökonomischen Genexpression ist dies jedoch sehr wahrscheinlich.

Um herauszufinden, ob AF4N nur freies P-TEFb bindet, wurde diese Interaktion mit Hilfe von rekombinantem GST-AF4N, GST als Negativkontrolle und GST-Tat als Positivkontrolle untersucht. Dazu wurden diese Proteine an eine GST-spezifische Matrix gebunden und mit Gesamtzelllysaten aus 293T Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Proteine vom Lysat separiert, von der Matrix eluiert und aus den Elutions-Fraktionen die 7SK snRNA gewonnen und mittels quantitativer PCR relativ quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass GST-AF4N signifikant mehr (~5fach) 7SK snRNA bindet als die GST-Negativkontrolle, gleichzeitig aber nicht die gleiche Potenz wie das Tat Protein zeigte. Der N-Terminus des AF4 ist damit in der Lage, nicht nur freies P-TEFb zu binden, sondern auch mit einem integralen Bestandteil der Speicherkomplexe zu interagieren. Umgekehrt führte die Untersuchung in den inkubierten Lysaten zu einer deutlichen Reduktion an 7SK snRNA. Dies war der Fall bei Verwendung einer kommerziellen RNase, bei der Inkubation mit GST-AF4N und mit einem Lysat aus AF4ST überexprimierenden 293T Zellen. Da in diesem Versuch das eingesetzte GST-AF4N vor Isolierung der RNA nicht entfernt wurde, ist dieser Effekt nicht mit einer 7SK snRNA Depletion des Lysates zu erklären. Es handelte sich vielmehr hierbei um eine spezifische Degradation der 7SK snRNA. Um die Spezifität zu zeigen, wurde eine Relation der Kopienzahl zu β -Actin RNA durchgeführt. Damit wurde deutlich, dass AF4 zumindest indirekt die 7SK snRNA binden und eine Rekrutierung des P-TEFb durch deren gezielte Degradation einleiten konnte.

Auf Basis dieser Ergebnisse, nämlich die Interaktion zwischen AF4 und P-TEFb bzw. der 7SK snRNA ist die Rekrutierung des P-TEFb vermutlich die zentrale Funktion des AF4 Proteins. Obwohl die Bindung von P-TEFb an den N-Terminus des AF4 bereits mehrfach in dieser und anderen Arbeiten gezeigt wurde, ist noch völlig unklar, ob unterschiedliche P-TEFb-haltige Komplexe existieren. Um die Verteilung des P-TEFb Heterodimers aufzuklären, wurden Gesamtzelllysate aus mit AF4ST oder AF4NST transfizierten 293T Zellen sowie einer Leervektor-Negativkontrolle über einen 0-40%igen Glycerolgradienten aufgetrennt. Dabei kommt es zu einer Auftrennung der Proteine bzw. der Proteinkomplexe gemäß ihres Molekulargewichts als Funktion der durch den Glycerolgehalt ansteigenden Viskosität in den

Fraktionen des Gradienten. Die Betrachtung der Negativkontrolle zeigte eine heterogene Verteilung des CDK9 über die Fraktionen des Gradienten. Eine Ausnahme bildete die erste Fraktion (Lysatüberstand), was ein vollständiges Eindringen des Lysatproteine in den Gradienten bewies. Die gleichzeitige Betrachtung der Verteilung des LARP7 zeigte eine Fokussierung auf niedrigviskose Fraktionen (5-15%), was die höher-molekularen Speicherkomplexe repräsentierte. Analog zu den Ergebnissen aus HeLa Zellen war ungefähr die Hälfte des CDK9 in LARP7-enthaltenden Fraktionen vorhanden und damit vermutlich inaktiv in den Speicherkomplexen. Die Überexpression von AF4ST oder AF4NST führte hingegen zu einer uniformen und deutlichen Veränderung dieser Verteilung. Ein Großteil des CDK9 verschob sich in niedrigviskose Fraktionen (10-20%), in denen sowohl AF4 als auch AF4N detektiert wurden. Gleichzeitig kam es zu einer Verdrängung des LARP7 aus diesen Fraktionen und zu einer Retention in höher viskose Fraktionen (20%+). Um nachzuprüfen, ob die Co-Fraktionierung des AF4 und CDK9 spezifisch ist, wurde aus den Fraktionen des Gradienten eine Immunpräzipitation des AF4 durchgeführt, die eine Interaktion mit CDK9 in der Eluat-Fraktion aufzeigte.

Dieses Resultat führte zu einigen interessanten Interpretationen. Zum Einen waren die AF4/P-TEFb Komplexe durch ihre Lokalisation in höher viskosen Fraktionen etwas kleiner als die Speicherkomplexe. Dies deutete darauf hin, dass der 2 MDa AF4 MPC eine dynamische Zusammensetzung hat und ein Teil der assoziierten Proteine nicht immer gleichzeitig bindet. Es existieren vermutlich distinkte Kontext-abhängige Kompositionen (AF4/P-TEFb, AF4/DOT1, SECs etc.), was im Einklang zu der beschriebenen flexiblen Bindekonformation steht (*fold-on-demand*). Analog zu der erhöhten Bindekapazität und mehr bindenden Faktoren war der AF4N MPC leicht zu höheren Molekulargewichten verschoben. Zum Anderen war die Umverteilung des LARP7 insofern bemerkenswert, als dass LARP7 nur noch in sehr hochviskosen Fraktionen gefunden wurde. Betrachtet man die Komposition der Speicherkomplexe, bildet der Anteil des P-TEFb weniger als die Hälfte des Molekulargewichts und das Auftreten von 300+ kDa großen Komplexen in diesen Fraktionen ist zudem unwahrscheinlich. Es konnte vielmehr davon ausgegangen werden, dass dies freies LARP7 darstellte, also die Desintegration der Speicherkomplexe durch Degradation der 7SK snRNA in diesem System nachgestellt werden konnte. Ein direkter Nachweis einer solchen Degradation war an dieser Stelle leider nicht möglich, da die Isolierung der RNA aus den stark glycerolhaltigen Fraktionen keine Ergebnisse erbrachte.

Weiterhin wurde analog zu den Arbeiten von Fujinaga *et al.*⁷²⁴ eine Fraktionierung von 293T Zellen durchgeführt, die entweder mit AF4ST oder einer Leervektor-Kontrolle transient transfiziert wurden. Dabei wurde die Isolierung einer Niedrigsalzfraktion mit 7SK snRNPs (nukleäre Fraktion) und einer Hochsalzfraktion mit Chromatin-gebundenes P-TEFb gewählt.

Im Western-Blot zeigte eine deutliche Verdrängung des CycT1 aus der 7SK snRNP Niedersalzfraction in Anwesenheit des AF4ST, analog zu einer Rekrutierung aus den Speicherkomplexen. Gleichzeitig wurde LARP7 in der Hochsalzfraction um die Hälfte reduziert, wobei es insgesamt zu einer Verminderung der detektierbaren Menge an LARP7 in den Fraktionen kam. Dies war analog zu den Ergebnissen aus den Glycerolgradienten und könnte darauf hinweisen, dass freies LARP7 nach Zersetzung des Speicherkomplex in der Zelle degradiert wird. Überraschenderweise zeigte das Niveau an CDK9 im Gegensatz zu CycT1 keine sichtbare Änderung zwischen den Fraktionen, war aber generell nur in den Hochsalzfractionen deutlich zu sehen. Die Ursache hierfür ist unklar, es ist jedoch möglich, dass im Prozess der Fraktionierung die CycT1-LARP7 Bindung im 7SK snRNP dominant gegenüber der CycT1-CDK9 Bindung ist und daher die Isolierung der Niedersalzfraction zum Verlust des CDK9 führt, welches damit in die Hochsalzfraction übergeht. Grundsätzlich ist die Trennschärfe zwischen den beiden Fraktionen verbesserungsbedürftig, im Kontext der anderen Ergebnisse konnte hier jedoch unabhängig von anderen Methoden ebenfalls die Dissoziation von P-TEFb aus den Speicherkomplexen gezeigt werden.

Schlussendlich konnte eine Re-Lokalisation von P-TEFb auch durch *in vitro* Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die transiente Transfektion von 293T Zellen mit AF4ST-mC, BFP-CycT1 und GFP-HEXIM1 zeigte drei unterschiedliche Situationen der CycT1 Verteilung im Zellkern. Während die Anwesenheit des AF4 bzw. AF4N zu einer diffuseren Verteilung des CycT1 führte, wurde dieser Effekt durch HEXIM1 umgekehrt und das BFP-markierte CycT1 war lediglich in stark fokussierten, singulären Loci im Zellkern sichtbar. Eine gleichzeitige Überexpression von GFP-HEXIM1 und AF4ST-mC zeigte das Auftreten beider Verteilungsmuster, wobei die Anwesenheit von AF4St-mC eine leichte Dominanz in der Ausprägung ausübte. So zeigten Zellkerne mit nachweislicher Expression aller drei Konstrukte eine eher diffuse Verteilung des BFP-CycT1. Es war allerdings selbst bei der angewendeten, stringenten Auswertung durch die Fluoreszenzfilter eine gewisse gegenseitige Einstrahlung im Falle der dreifachen Transfektion nicht völlig auszuschließen, was im Falle stark fluoreszierender Kerne deutlich wird. Aus diesem Grund und der sicheren Interferenz mit den Signalen des BFP-CycT1 musste auf eine DAPI-Färbung der Zellkerne verzichtet werden. Es soll jedoch bezüglich der Auflösung der Kanäle an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Zellen nicht artifiziell fixiert wurden, sondern alle Aufnahmen aus lebenden Zellen in Kultur stammen. Vor allem die doppelten Transfektionen zeigen in jedem Fall die beschriebenen Unterschiede deutlich auf.

Es bleibt zu klären, was die diffuse Verteilung des BFP-CycT1 bedingt, also welche Ziele durch das P-TEFb in Anwesenheit des AF4 bzw. AF4N angesteuert werden. Es erscheint nachvollziehbar, dass im Falle einer Überexpression des HEXIM1 und damit der stärkeren

Inkorporation in die Speicherkomplexe sich ein Reservoir aus inaktivem P-TEFb bildet, das eine fokussierte Lokalisation im Zellkern besitzt. Es könnte sich dabei sogar um die unlösliche Kernfraktion handeln, was auf eine Übersättigung hindeuten würde. Eine solchermaßen zentralisiertes Modell hat durchaus Vor- und Nachteile. Zum Einen fördert eine solche Zentralisierung die Etablierung uniformer Mechanismen in der Rekrutierung von P-TEFb, d.h. alle rekrutierenden Faktoren (wie z.B. Transkriptionsfaktoren) können Gen-unspezifisch aus diesem Reservoir P-TEFb beziehen. Auf der anderen Seite ist ein solches Reservoir stark unflexibel und vergleichsweise langsam, da keine proximale Lokalisation zu Genen besteht, die im Bedarfsfall schnell aktiviert werden müssen. Betrachtet man dagegen die Tatsache, dass viele Gene durch den Elongationsarrest reguliert werden, also Promotor-proximal pausierte RNAP II aufweisen, darf die Zentralisierung jedoch auch als Sicherungsmechanismus verstanden werden. Eine direkte Lokalisation der Speicherkomplexe an solchen Genen erhöht vor allem bei Koexistenz mehrerer rekrutierender Faktoren die Rate fehlerhafter Genaktivierung deutlich gegenüber einer zentralisierten Speicherstelle. Gegen das Argument der Flexibilität spricht weiterhin, das P-TEFb nach der Dissoziation aus dem Speicherkomplex zum Erreichen aktiver enzymatischer Funktion noch post-translationaler Modifikation bedarf, wodurch in jedem Fall eine Re-Lokalisation des P-TEFb oder aber der Effektoren nötig ist. Da die Expression von AF4ST in den Vorarbeiten zu einer Induktion des HEXIM1 führte und ein Abbau des HEXIM1 in dieser Arbeit ebenfalls nicht ersichtlich war, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen Kompartimenten um proteasomal aktive Loci wie z.B. die Clastosomen handelt.

Bei der nach Überexpression des AF4 auftretenden, diffus-punktierten Lokalisation des BFP-CycT1 handelt es sich vermutlich um die Verteilung auf die transkriptionell aktiven "*nuclear bodies/dots*"⁷³⁷, membranlose Kernorganellen, welche zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung sind. Die "Kernkörper" werden im Kern während der Interphase gebildet und bilden analog zu den Zellorganellen im Zytoplasma definierte Kompartimente, deren konzentrierte Bestandteile stark funktionsabhängig sind⁷³⁸. Es sind mittlerweile 10 verschiedene Unterformen dieser Kernkörper definiert worden, die eine starke funktionelle Diversifikation aufweisen⁷³⁹. Gemessen an der beobachteten Zahl dieser Kernkörper und der funktionellen Assoziation mit der Transkription könnte es sich hier um die "*nuclear speckles*" handeln. Diese sind eng mit aktiven Genen assoziiert und zeigen neben der Anwesenheit von prä-mRNA modifizierenden Faktoren auch am Serin 2 der CTD phosphorylierte RNAP II sowie P-TEFb selbst^{361,740}. Die 7SK snRNA zeigt im Gegensatz dazu keine Präsenz in solchen Kernkörpern⁷⁴¹, was auf die aktive Form des P-TEFb in den *nuclear speckles* hindeutet. Interessanterweise wurde auch FB-1 (*TCF3 (E2A) fusion partner (in childhood Leukemia)*) in diesen Kernorganellen nachgewiesen, welches dort mit Tat-P-TEFb interagiert und die HIV-1 Transkription aktiviert^{742,743}. Es konnte jedoch keine aktive Transkription in

diesen Kernkörpern nachgewiesen werden⁷⁴⁴, was darauf hindeutet, dass diese Loci im Zellkern als funktionell getrennte Assemblierungsstandorte für Elongationskomplexe (SEC, AF4 MPC) dienen und diese Komplexe in der Folge zu den proximal lokalisierten, aktiven Genen translozieren. Auf der anderen Seite könnte es sich bei diesen Loci auch schlicht um die fixierten Transkriptionsfabriken (*transcription factories*) handeln^{47,48,745}, an denen durch eine starke Erhöhung der lokalen Konzentration Transkriptions-assoziiierter Faktoren und Substrate wie der RNAP II⁷⁴⁶ eine effektive und erhöhte Produktion gewährleistet ist. So wurden 95% der naszierenden RNA-Transkripte mit diesen Fabriken assoziiert vorgefunden^{747,748}. Da die Elongation besonders in einem Modell der immobilen Polymerase wichtig für das Prozessieren entlang der beweglichen DNA-Matrize ist, erscheint es sinnvoll, die Elongationskomplexe proximal der Polymerasen vorzufinden. Während die Blockade einer Polymerase in einem mobilen Modell (*tracking*) auch durch die Dissoziation der RNAP II vom Matrizenstrang auflösbar wäre, bedeutet eine statische Platzierung der RNAP II (*fixed*) in den Transkriptionsfabriken das Aufstauen der gesamten strangabwärts liegenden Matrize. Eine exzellente Beschreibung der Mechanismen von Transkriptionsfabriken sei an dieser Stelle erwähnt⁷⁴⁹. Da diese Transkriptionsfabriken nicht nur komplex sondern auch sensitiv gegenüber den relativ unsanften Methoden der Aufreinigung sind (es wurde bisher keine *in vitro* Charakterisierung beschrieben), ist es von Bedeutung, dass die Zellen vor der Beobachtung unter dem Mikroskop nicht artifiziell fixiert wurden, sondern in einem physiologischen Kontext eingebettet waren. Es wird jedoch zweifelsfrei weitere Untersuchungen benötigen, um die Natur dieser Loci eindeutig zu klären. So könnte durch immunhistochemische Versuche oder die Markierung naszierender RNA die Co-Lokalisation definierender Faktoren der *nuclear speckles* oder der Transkriptionsfabriken mit AF4 aufgezeigt werden.

Der abschließende Versuch zur Aufzeigung der Aktivierung der Transkription durch AF4 war die Messung der totalen RNA in der Zelle nach transienter Transfektion von einem RFP exprimierenden Kontrollvektor, AF4ST und RFP-markiertem HCMV IE1 in 293T Zellen. Da keine doppelt stabile Zelllinie bezüglich AF4ST und IE1 erzeugt wurde, ist die parallele transiente Transfektion beider Faktoren einer Induktion des AF4ST nach Einbringung des IE1 vorzuziehen. Um trotzdem eine homogene Population zu erhalten, wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion stringent einer Fluoreszenz-basierten Zellsortierung am FACS unterzogen. Nur solche Zellen, die den gewählten Kriterien (lebend, vereinzelt und mit einer definierten relativen Fluoreszenz) entsprachen, wurden in die Bestimmung einbezogen. Die Isolation der RNA aus den Zellen sowie die Normierung auf die eingesetzte Zellzahl zeigte ein klares Bild. So führte die Überexpression von AF4ST zu einer ca. 2,5fachen Erhöhung der Menge an RNA in den Zellen. Während die Einzeltransfektion von IE1 keinerlei Veränderung erwirkte, führte die Kombination von AF4 und IE1 zu einer

signifikanten Erhöhung um das 4,5fache, was analog zu den Versuchen der P-TEFb Rekrutierung auf einen kooperativen Effekt beider Proteine hinwies. Die korrekte Lokalisation der RFP-markierten IE1 wurde dabei durch *in-vitro* Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, weiterhin ist auch eine stärkere Expression der IE1 sichtbar. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die Aktivität des AF4 gegenüber P-TEFb auch in einem funktionell relevanten, quantifizierbaren Signal dargestellt werden kann. Dass die Effekte des AF4, auch wenn deutlich zu erkennen, rechnerisch keine Signifikanz aufweisen ist durchaus der Methodik geschuldet. So führt die Anwendung der stringenten Kriterien beim Sortieren der Zellen zu geringen Zellzahlen während der RNA-Isolierung, was geringe Schwankungen deutlich amplifiziert. Die Verwendung weicherer Kriterien oder der Einsatz einer merklich heterogenen Population würde die Resultate dieses Versuches jedoch erheblich mehr verfälschen, insofern a) die induktiven Effekte moderat sind, was auf die Beeinflussung der lediglich Elongations-gesteuerten mRNAs zurückzuführen ist und b) der durch die Sortierung induzierte, erhebliche Zellstress unvorhersehbaren Einfluss auf die Aktivierung ebenfalls Elongations-gesteuerter Gene der Primärantwort haben kann³⁸⁰.

4.4. AF4 als Ko-Faktor der IE-Proteine von humanen Herpesviren

Es konnte sowohl durch die Dissoziation der Speicherkomplexe als auch durch die Beeinflussung des zellulären RNA Niveaus gezeigt werden, dass das HCMV IE1 Protein Effekte gegenüber P-TEFb zeigt. Vor Allem die kooperative Wirkung mit AF4 im Falle der Induktion der RNA-Synthese legte nahe, dass HCMV IE1 und spekulativ auch andere virale IE-Faktoren in der Lage sind, den AF4 MPC für die Induktion viraler Genexpressionsprogramme zu nutzen. Da die viralen IE-Faktoren entscheidend für den Übergang zur lytischen Phase im Lebenszyklus der Viren sind und die Steuerung der Expression einer Vielzahl von *early* und *late* Genen übernehmen, sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob AF4 als wirtseigener, Transkriptionelsongation-assoziiierter Faktor ein funktionelles Ziel der IE Proteine sein kann. Die Grundlage für die Einbeziehung der viralen Proteine liegt in der Feststellung, dass im Falle einer gleichzeitigen Überexpression von AF4 als auch des HCMV IE1 eine deutlich stärkere Expression des AF4 zu beobachten war. Eine alleinige Überexpression des IE1 zeigte hingegen keine sichtbare Erhöhung der endogenen AF4 Expression und konnte auch in den RNA-Synthese Versuchen keinen Effekt hervorrufen. Um diese Effekte aufzuklären, wurden Reporter-genversuche durchgeführt, in denen die Induktion des *ALOX5* Gens in Abhängigkeit des endogenen Promotors bzw. unabhängig des Promotors betrachtet wurden. Dabei wurde zusätzlich zu AF4 oder AF4-MLL eine Reihe von IE-Proteinen aus anderen dsDNA-Viren (HPV16, HSV-1, KSHV, EBV) sowie dem HCMV IE2 co-exprimiert. Die Wahl dieses Versuchsaufbaus soll kurz erläutert werden. Die Wahl von dsDNA Viren lag in deren Verwandtschaft zum HCMV und der Anwesenheit funktionell

analoger IE-Faktoren begründet. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Geni einer Virenfamilie (*Herpesviridae*, Ordnung: *Herpesvirales*) ähnliche oder sogar identische Mechanismen zur Übernahme wirtseigener Proteine entwickelt haben. Zum Abgleich wurden Vertreter einer anderen Familie, der *Papillomaviridae*, gewählt, die zwar ebenfalls zu den dsDNA-Viren zählen, jedoch einer anderen Ordnung angehören. Das HPV16 war aufgrund seiner Assoziation mit Krebserkrankungen (Gebärmutterhalskrebs) insofern ein interessanter Kandidat, als dass eine Interaktion mit AF4 und besonders AF4-MLL einen neuen Feld viral bedingter, onkogener Transformationen hätte eröffnen können. Dies war unter anderem auch ein Grund für die Einbeziehung des gesamten AF4-MLL Proteins anstatt lediglich der N-Terminalen Domäne AF4N. Gerade in Patienten mit einer primären ALL aufgrund der t(4;11)-Translokation wäre es im Falle eines kooperativen Effekts interessant, die Korrelation zwischen einer pränatalen oder sehr frühen Infektion mit solchen Viren und der Entstehung der ALL zu überprüfen. Leider wird eine solche virale Diagnostik z.B. gegenüber HCMV nicht routinemäßig sondern nur im Falle einer notwendigen Immunsuppression bei allogener Stammzelltransplantation in ALL-Patienten durchgeführt. Von daher war eine direkte Korrelation nicht möglich.

Der Grund für die Wahl des *ALOX5* Gens unter Kontrolle des endogenen Promotors war ebenfalls mehrschichtig. Zu Einem handelt es sich bei diesem System in Hinblick auf den HCMV um ein sehr gut etabliertes System, dessen Effekte beschrieben sind⁷²⁵⁻⁷²⁷. Zum Anderen wird die 5-LO vorrangig in leukozytären Zellen wie den Monozyten, Makrophagen und auch den B-Lymphozyten exprimiert. Während der latenten Phase residieren Viren wie der HCMV oder auch EBV auch in diesen Zellen und induzieren in diesem Umfeld auch die Transition zur lytischen Phase^{563,566,610}. Gleichzeitig sind vor allem die Vorläuferzellen der B-Lymphozyten eng mit der Entstehung der t(4;11)-Translokation verbunden⁵¹⁸. Im Falle einer Kooperation zwischen AF4 oder AF4-MLL und IE-Proteinen der Viren sollte dies damit Einfluss auf die Induktion und Expression der 5-LO zeigen, insofern dass alle beteiligten Faktoren auch im physiologischen Kontext gleichzeitig vorhanden sein können. Da die produktive virale Expression nach primärer Infektion grundsätzlich auch in anderen Zelltypen gezeigt werden konnte^{566,570}, sollte die Verwendung der nicht-leukozytären HeLa Zellen die Effekte nicht unterbinden oder maskieren.

Aus den durchgeführten Reportergergenversuchen ließen sich zwei wesentliche Aussagen ableiten. So konnte eine Induktion des Reporters nur im Falle der Herpesviren gezeigt werden, die IE Proteine des HPV16 zeigten hingegen keine Induktion. Weiterhin war die Befähigung der einzelnen IE Proteine der Herpesviren zur Induktion stark unterschiedlich. Sie war vorrangig in Anwesenheit von Zta oder Rta des EBV (bis zu 7-facher Induktion) zu beobachten. Alle weiteren IE Proteine zeigten nur eine geringfügige, bis maximal 2-fache,

Induktion. Weiterhin waren die Effekte auf den Reporter nur in sehr geringem Umfang von AF4 oder AF4-MLL abhängig. Aufgrund der fehlenden Wirkung der HVP16 Proteine wurde deutlich, dass der gedachte Mechanismus der Rekrutierung des AF4 bzw. AF4-MLL MPCs eine Spezifität für bestimmte virale Geni zeigt. Er war damit nicht als generalisiert zu betrachten, jedoch ebenfalls nicht durch unspezifische Interaktionen mit viralen IE-Faktoren hervorgerufen. Weiterhin handelte es sich hier um distinkte Effekte der einzelnen Proteine, insofern als der gleichzeitige Einsatz von Zta und Rta bzw. IE1 und IE2 keine aktivierenden oder repressiven synergistischen Effekte hervorrief. Die Entscheidung, die IE Proteine des HCMV und des EBV weiter zu untersuchen, wurde aufgrund dieser Reportergergenversuche (Indikation für EBV) und der beobachteten stabilisierenden Effekte (Indikation für HCMV und EBV) getroffen.

Virale IE Faktoren können vermutlich bereits assemblierte AF4 MPCs bzw. SECs rekrutieren und diese durch Stabilisierung der zentralen AF4 Untereinheit dauerhaft aktiv halten. Die zusätzliche Überexpression des AF4 oder AF4-MLL führte so entweder nicht zwangsläufig zu einer verstärkten Assemblierung solcher Komplexe oder das Reportersystem war durch die existierenden, endogenen Komplexe bereits weitestgehend gesättigt. Ein solches Modell wurde durch die Ergebnisse aus den *knock-down* Zellen unterstützt. Zum Einen zeigten diese Daten unabhängig der viralen IE Proteine eine strikte Abhängigkeit des Systems vom AF4 Protein; da es sich hier jedoch um ein *knock-down* und nicht um ein *knock-out* System handelte, also durchaus noch AF4 Protein in der Zelle vorhanden war, wurde die Mengenabhängigkeit gegenüber AF4 unterstrichen. Es existiert vermutlich ein Schwellenwert im Niveau des exprimierten AF4 Proteins, der eine flexible Verteilung in SECs oder die funktionell distinkten AF4 MPCs bestimmt. Das ein hohes Niveau an AF4 Protein in den Zellen die Ausbildung der SECs begünstigt, geht mit den bisher in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen im Sinne der Rekrutierung des P-TEFb einher. Warum in dieser Hinsicht eine Überexpression des AF4 oder AF4-MLL in den *knock-down* Zellen nicht zu einer Komplementation des Systems führte, bleibt zu diskutieren. Das Eintreten der Zellen in die Seneszenz erschien unwahrscheinlich, insofern dass der konstitutive SV40-Renilla Luciferase Kontrollvektor noch exprimiert wurde. Eine Möglichkeit wäre eine Exon-lokalisierete, intrinsische Elongationskontrolle des *AF4* Gens proximal strangabwärts vom Startcodon. Sollte durch den *knock-down* das verringerte Niveau an AF4 Protein zu einem Favorisieren des AF4 MPC und dementsprechend dem Verlust an SECs geführt haben, so kann auch ein ektopisch eingeführtes *AF4* (oder auch *AF4-MLL*) Gen nicht exprimiert werden. Dass AF4-abhängige SECs - und nicht z.B. AF5-abhängige SECs - die putative Elongationskontrolle des *AF4* Gens regulieren könnten, ist im Hinblick auf die in der Biologie weitverbreitete Regulation durch negative Rückkopplung in Betracht zu ziehen. Die exakten Mechanismen hinter diesen Effekten verblieben jedoch noch unbekannt.

Ein weiterer, interessanter Fund bestand in der Tatsache, dass der Einsatz eines Promotorlosen Reporterkonstrukts zusammen mit den viralen IE Proteinen analog zu den *knock-down* Zellen zum praktisch vollständigen Verlust der Transaktivierung führte. Dies war insofern eine interessante Feststellung, als das dies ein Hinweis auf die direkte Beteiligung des AF4 MPC an der Initiation der Transkription war. Damit wurde deutlich, dass die Effekte des AF4 bzw. AF4-MLL Proteins als auch der viralen Proteine gegenüber des *ALOX5* Gens obligat von der Anwesenheit eines funktionellen Promotors abhängig waren. Es existierte zwar eine unterschiedliche Ausprägung der geringen Induktion am Promotor-losen Konstrukt. Inwiefern diese jedoch artifiziell bzw. durch artifizielle, physiologisch nicht genutzte Promotorelemente induziert war, bleibt vor Allem in Hinblick der Tatsache, dass solche Elemente sich vermutlich einer folgenden Elongationskontrolle entziehen, an anderer Stelle zu klären. Das sich an solchen Elementen jedoch geringe Effekte des AF4 bzw. AF4-MLL zeigten, unterstützt die These, dass AF4 auch einen Einfluss auf die Transkriptionsinitiation ausübt. Es bleibt zu vermuten, ob für die korrekte Induktion eines solchen Reporters weitere Faktoren notwendig sind (z.B. SP1 oder VDR/RXR α), die dem System von außen zugeführt werden müssen.

Da die Interaktion zwischen Tat, P-TEFb und den SECs beschrieben war, wurde das gleiche, zweiteilige Reportersystem mit einer Kombination von AF4 und Tat eingesetzt. Durch diesen Versuch sollte die These von den zwei distinkten, AF4-enthaltenden Komplexen (AF4 MPC und SEC) näher untersucht werden. Während im obigen System vermutlich ein Effekt des AF4 MPC gegenüber der Initiation eintrat, war die Interaktion mit Tat SEC-abhängig, und damit Elongations-abhängig, zu betrachten. Die erhaltenen Ergebnisse unterstützten diese Vermutung. So kam es in Anwesenheit des Promotorkonstrukts weder durch Tat alleine noch in Kooperation mit AF4 zu einer messbaren Induktion. Es gab also keinen Effekt gegenüber der Initiation. Wendete man diese Kombination auf das Promotor-lose Konstrukt an, führte die Kooperation von Tat und AF4 zu einer signifikant höheren Induktion gegenüber den Effekten von Tat alleine oder dem Promotorkonstrukt. Dies unterstrich (1) die kooperative Funktion zwischen Tat und den SEC bzw. besonders dem AF4 Protein und (2) die funktionelle Diversität des AF4 Proteins gegenüber Initiation und Elongation, was auf das Vorhandensein distinkter Komplexe hinwies.

Die beobachteten, funktionell kooperativen Effekte zwischen den IE Proteinen des HCMV bzw. EBV und dem AF4 Protein sowie die Stabilisierung desselben warfen die Frage auf, ob die viralen Proteine zu einer Rekrutierung des AF4 außerhalb seines endogenen Kontext fähig sind. Dazu wurde der AF4 MPC in Anwesenheit der RFP-markierten IE Proteine IE1, Zta und auch HPV16 E6/7 aufgereinigt und auf die Interaktion mit diesen als auch mit dem P-TEFb hin überprüft. Die Co-Transfektion der viralen IE Proteine führt zu einer deutlich

höheren Ausbeute an AF4 Protein im Zuge der Aufreinigung, wobei im Unterschied zu den induktiven Effekten auf das Reportergensystem HCMV IE1 einen leicht stärkeren, stabilisierenden Effekt zeigte. Die Gesamtproteinausbeute verfünffachte sich in diesem Fall. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass IE1 ebenso wie P-TEFb Teil des aufgereinigten Komplexes ist und in den Eluat-Fractionen vorgefunden wurde. Die Stabilisierung des AF4 führte nicht zu einer unspezifischen Akkumulation an Protein, sondern vielmehr zu einer Ausbildung von funktionellen MPCs, wie an der ebenfalls steigenden Menge an P-TEFb (CDK9/CycT1) gezeigt werden konnte. Interessanterweise war dieser Effekt im gleichen Maße im Falle der Co-Transfektion von BZLF1 zu sehen, obwohl die Gesamtausbeute an Protein geringer ausfiel. Da die Interaktion zwischen Zta und AF4 jedoch wie gezeigt deutlich schwächer ausfiel, kann dies auf die wesentlich geringere Anwesenheit an IE Protein in den Komplexen zurückzuführen sein. Eine dritte, bemerkenswerte Beobachtung war der mit BZLF1 vergleichbare, stabilisierende Effekt durch HPV16 E6/7, der jedoch weder zu einer Induktion im Reportergensystem noch zu einer verstärkten Inkorporation von P-TEFb in die AF4 MPCs führte.

Damit muss zwischen drei Effekten (Stabilisierung, P-TEFb Inkorporation, Transaktivierung des 5-LO Systems) gegenüber dem AF4 Protein unterschieden werden. Es kam im Falle des HCMV, des EBV und auch des HPV16 zu einer Stabilisierung des AF4 Proteins, nicht jedoch zu einer verstärkten *AF4* Genexpression. Die Ursache für die Stabilisierung wurde eingehend untersucht, konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. So kam es nicht zu einer Ubiquitylierung oder Sumoylierung des AF4 Proteins, noch zu repressiven Effekten gegenüber den SIAH-Ligasen⁴⁸⁵ weder auf Ebene der mRNA noch auf Ebene der Proteine (nicht gezeigt). Eine generelle Blockade des Proteasoms vergleichbar mit dem Einsatz von MG132 konnte aufgrund der unveränderten Zellmorphologie sowie Zellviabilität über mehr als 48 Stunden ausgeschlossen werden. Es bleibt einzig die Möglichkeit, dass die Interaktion zwischen den IE Proteinen und AF4 zu einer gezielten Blockade der SIAH-Bindestelle im AF4 N-Terminus führt und somit die post-translationale Polyubiquitylierung und subsequente Zuführung zum proteasomalen Abbau unterbunden wird. Darauf abgezielte, prä-eliminäre Daten aus Co-Immunpräzipitationen konnten diese Theorie jedoch ebenfalls nicht bestätigen (nicht gezeigt). Weiterhin führten *in silico* Analysen der Primärsequenzen von IE1, Zta und E6/7 zu keiner signifikanten Übereinstimmung von Proteindomänen, Aminosäuresequenzen oder -mustern die eine gemeinsame Bindedomäne an das AF4 Protein nahe legen würden. IE1 und Zta verfügen zwar beide über eine - nicht-identische - C-terminal orientierte bZIP-Domäne (Leucin-Zipper), deren Funktion ist jedoch im Bereich der DNA-Bindung bzw. Dimerisierung von Proteinen und nicht die Interaktion in Heterodimeren. Eine analoge Domäne konnte zudem in E6/7 oder auch dem AF4 Protein nicht festgestellt werden. Während das HPV16 E6/7 Protein in den befallenen Epithel- und Schleimhautzellen

zwar durchaus mit AF4 interagieren könnte, konnte eine solche Interaktion weder durch die Aufreinigung des AF4 MPC noch durch Co-Immunpräzipitationen nachgewiesen werden. Weiterhin ist eine Interaktion mit dem AF4-MLL Protein aufgrund der distinkten Lokalisierung im Wirtskörper unwahrscheinlich. Die Spezifität und Relevanz dieses stabilisierenden Effektes durch E6/7 muss damit hinterfragt werden und benötigt weitere Aufklärung.

Konträr dazu konnte die Interaktion zwischen AF4 und HCMV IE1 und auch IE2 bzw. EBV Zta und Rta direkt durch eine Co-Immunpräzipitation gezeigt werden. Dabei war auffällig, dass die Interaktion mit Zta oder Rta deutlich schwächer ausfällt, was in Einklang mit der beobachteten, geringeren Stabilisierung des AF4 Proteins steht, in Hinblick auf das stärker transaktivierende Verhalten in den Reportergerätsversuchen jedoch überraschte. Umgekehrt war die Interaktion mit IE1 und IE2 sichtbar stärker. Betrachtete man die erhaltenen Ergebnisse bis zu diesem Punkt, so deuteten sich zwei ähnliche, jedoch nicht identische Mechanismen der Vereinnahmung des AF4 Proteins durch die viralen IE Faktoren an. Im Falle des HCMV kommt es demnach zu einer unmittelbaren, starken Interaktion mit AF4 als auch der Rekrutierung von P-TEFb sowie der folgenden Stabilisierung der P-TEFb-AF4-IE1/IE2 Komplexe. Gleichzeitig ist das transaktivierende Potential dieser Komplexe gegenüber dem 5-LO Reportersystem vermutlich von zusätzlichen Transkriptionsfaktoren wie z.B. SP1 oder VDR/RXR α abhängig, so dass in einem System der Überexpression die volle Transaktivierung nicht erreicht wird. Die im Vorfeld gezeigte Erhöhung der Gesamt-RNA durch die kooperative Funktion von IE1 und AF4 zeigte abseits des 5-LO Systems jedoch deutlich, dass ein generell transaktivierendes Potential vorhanden ist. EBV Zta ist hingegen (1) entweder ein deutlich potenterer Stabilisator des AF4 Proteins oder (2) vermittelt diese Funktion über einen noch unbekanntem Mediator, wie z.B. p65 des NF κ B⁶⁸⁴, und ist selbst nur transient im AF4 MPC vertreten. Dass der eingangs gezeigte *knock-down* des AF4 zu einer Erhöhung des Proteinlevels von NF κ B führte, unterstützt ein Modell, in dem p65 eine stabilisierende Wirkung gegenüber dem AF4 MPC ausübt und somit von EBV Zta entsprechend eingesetzt werden kann.

Abschließend wurde die Wechselwirkung zwischen dem HCMV IE1 und dem AF4 Protein näher untersucht. So konnte durch ChIP-Experimente gezeigt werden, dass eine Überexpression von AF4 in 293T Zellen verglichen zu einer Leervektor-Kontrolle zu einer signifikant höheren Acetylierung des Histon H3 über den gesamten Genkörper des endogenen *ALOX5* Gens führte und damit die transkriptionell aktivierende Funktion des AF4 unterstrichen wurde. Gleichzeitig erzeugte die Anwesenheit des IE1 Proteins zu einer merklichen und teilweise signifikanten Reduktion dieses Acetylierungsstatus. Die Rolle der Induktion der 5-LO durch die Anwesenheit des HCMV ist noch unklar, so können die folgenden, Leukotrien B₄-vermittelten inflammatorischen Reaktionen die Reaktivierung des

HCMV induzieren^{750,751}, physiologische Dosen dieses Leukotriens zeigten aber auch antivirale Eigenschaften^{752,753}. Die hier gezeigten, transkriptionell repressiven Effekte des IE1 gegenüber dem *ALOX5* Gen unterstützen damit die These einer antiviralen Funktion der 5-LO Induktion und lieferten gleichzeitig eine mögliche Erklärung für die schwachen Effekte in den Reporter-genversuchen durch IE1 und IE2.

Da sämtliche, hier gezeigte, Effekte in einem artifiziellen 293T bzw. HeLa Zellsystem durchgeführt wurden, wurde abschließend der Effekt der Stabilisierung des AF4 Proteins durch IE1 in Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19) gezeigt. Diese sind insofern physiologisch relevant, als dass es sich hierbei um einen Zelltyp handelt, in dem eine produktive Replikation des HCMV stattfindet⁵⁶⁸. 48 Stunden nach transienter Transfektion der Zellen mit Expressionsplasmiden für HCMV IE1, 5-LO und AF4ST wurden die Zellen fixiert, mit AF4- und 5-LO-spezifischen Primärantikörpern sowie mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern behandelt, DAPI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Die immunohistochemische Detektion der 5-LO als auch des AF4 Proteins erfolgte nur in Anwesenheit des IE1, was zum Einen die induktive und funktionelle Wirkung des IE1 bestätigte, als auch den stabilisierenden Effekt gegenüber dem AF4 Protein in diesen Zellen aufzeigte. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass die aktive 5-LO nach Induktion zur Kernhülle transloziert und dort ihre katalytische Funktion in der Leukotrienbiosynthese ausführt⁷⁵⁴. Die gezeigte Kernlokalisation ist durch die mikroskopische Aufsicht auf das Präparat zu erklären. Damit kann auch außerhalb des artifiziellen Zellsystems der vorgeschlagene Mechanismus einer funktionellen Interaktion zwischen IE1 und dem AF4 Protein angenommen werden.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

Substanzen	Bezugsquelle (Firma)
Aceton	Roth
Acrylamid	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
6-Aminocapronsäure	Roth
Ammoniumhydrogensulfat	Fluka
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APOD)	Roth
Avidin	IBA GmbH
Biotin	Sigma
Bisacrylamid	Roth
Brillantblau R-250	Sigma
Brillantblau G-250	Sigma
Brom-Phenol-Blau	Roth
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth
CaCl ₂	Merck
N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure (CAPS)	Sigma
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	PEQLAB
Dithiothreitol (DTT)	Biomol
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Doxycyclin	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth
Essigsäure	Riedel De Haen
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerin 86%	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Oxio
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-	Roth

5. Material und Methoden

ethansulfonsäure (HEPES)	
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Saxon
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Roth
Lysozym	Sigma
Methanol	Roth
MG132	Calbiochem
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Roth
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	New England Biolabs
NaAc	Merck
NaCl	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol
NaF	Riedel De Haen
NaH ₂ PO ₄	Merck
Na ₃ VO ₄	Sigma
Nonidet P-40 (NP-40)	AppliChem
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche
Protaminsulfat	Millipore
Protein-G-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Puromycin	Sigma
RNase	Sigma
RNasin	Promega
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka
Tris	Roth
Triton X-100 (Octoxinol 9)	Sigma
Trockenmilch (fettfrei)	USA (TOPS)
Tween 20 (Polysorbat 20)	Roth

Nährmedien und Zusatzstoffe	Bezugsquelle (Firma)
-----------------------------	----------------------

β -Mercaptoethanol	Roth
Accutase	PAA
DMEM, High Glucose	PAA
FCS	PAA
L-Glutamin (200mM, 100x)	PAA
Natriumpyruvat (100mM)	PAA
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
Polyethylenimin	Sigma

5. Material und Methoden

Trypan Blue Stain	Invitrogen
Ziegenserum	Sigma

Geräte	Bezugsquelle (Firma)
--------	----------------------

Abi Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Analysenwaage TE124S	Sartorius
Blotting-Apparatur Trans-Blot® Turbo	Bio-Rad
Blotting-Apparatur für Semi-dry Western Blots	CBS Scientific
Blotting-Apparatur für Tank Western Blots	Bio-Rad
Brutschränke	Heraeus
CO ₂ -Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific
Durchlichtmikroskop	Nikon
Elisa-Reader MR5000	Dynatech
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Carl Zeiss AG
Gelkammer für Agarose Gele B2	Owl
Gene Pulser™	Bio-Rad
Heizblock	Liebisch
Magnetrührer RCTbasic	IKA Labortechnik
MolecularImager ChemiDoc XRS+	Bio-Rad
Nanophotometer P330	Implen
PCR-Gerät GeneAmp® 9700	Applied Biosystems
PCR-Gerät für qPCR StepOne Plus	Applied Biosystems
pH-Meter RCTbasic	IKA Labortechnik
Rollmischer SRT6D	Stuart
Rotationsschüttler KS250basic	IKA Labortechnik
Rotator SB3	Stuart
Schüttelinkubator CH4103	Infors AG
Spannungsquelle EV265	Consort
Spektralphotometer U-2000	Hitachi
SterilGard Hood (LaminAir HB2472)	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge Zellkultur 5702R	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikropplatten Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
Ultraschallgerät mit CE Converter 102C Spitze	Branson
Ultraschallgerät ChIP Bioruptor™ NextGen	Diagenode
Ultrazentrifuge L-70 mit Rotoren 60Ti/W41Ti	Beckman
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Wasserbad	Julabo

5. Material und Methoden

Wasserbad Zellkultur SW-20C	Julabo
Zellzähler TC10™	Bio-Rad
Zentrifuge J6-HC mit Rotor JLA	Beckman
Zentrifuge J2-HS mit Rotor JA20	Beckman

Enzyme für die Molekularbiologie

Bezugsquelle (Firma)

Alkalische Phosphatase	New England Biolabs
Klenow-Fragment	MBI Fermentas
PCR Extender Polymerase Enzym Mix	5 Prime
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNAse	Sigma
Superscript® II Reverse Transkriptase	Invitrogen™
T4-DNA-Ligase/QuickLigase	New England Biolabs
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
T4-DNA-Polymerase	Promega

Sonstige Materialien

Bezugsquelle (Firma)

3MM Chromatographiepapier	Whatman
96-well Mikrotiterplatten	Greiner bio-one
Anti-FLAG® M2 Magentic Beads	Sigma
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Cellstar Gewebekulturschalen (diverse)	Greiner bio-one
Chromatographiesäulen	BioRad
ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare
HIS-Select® Nickel Magnetic Agarose Beads	Sigma
Mikrozentrifugengefäße	Eppendorf
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Parafilm "M"	Pechiney
pTARGET™ Mammalian Expression System	Promega
PCR Gefäße	Greiner bio-one
Pierce® Glutathione Magnetic Beads	Thermo Scientific
Polypropylensäulen (5 ml)	Qiagen
Prestained Protein Ladder, broad range	New England Biolabs
Protease Inhibitor Cocktail Set (100x, PIC)	Calbiochem
PureYield™ Plasmid MaxiPrep System	Promega
PVDF Membran	GE Healthcare
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen

5. Material und Methoden

RNeasy™ Mini Kit	Qiagen
Sequenziergefäße	Applied Biosystems
Strep-Tactin Säulen	IBA GmbH
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories

5.1.2. Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I pH 10,4 (Western-Blot)	300 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II pH 10,4 (Western-Blot)	25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Bindungspuffer pH 8,0 (GSH-Beads)	125 mM Tris, 150 mM NaCl
Blockierpuffer (IHC)	3% (v/v) Ziegen Serum in 1xPBS
CAPS-Puffer (Western-Blot)	10 mM CAPS pH 11, 0,1% (v/v) Methanol, 0,01% (w/v) SDS
ChIP-Puffer A	50 mM HEPES pH 7,6, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA
ChIP-Puffer B	20 mM HEPES pH 7,6, 0,25% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA
ChIP-Puffer C	50 mM HEPES pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA
DNA-Ladepuffer	50% (w/v) Saccharose, 100 mM EDTA, 0,1% (w/v) Brom-Phenol-Blau, 0,1% (w/v) Xylen-Cyanol-FF
Elutionspuffer pH 8,0 (Ni-NTA-Agarose)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Elutionspuffer pH 8,0 (GSH-Beads)	125 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM reduziertes Glutathion
Elutionspuffer pH 8,0 (Strep-Tactin-Säulen)	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Biotin
Elutionspuffer pH 8,0 (RNA-Bindung)	50 mM Tris pH 8,0, 10 mM reduziertes Glutathion
Elutionspuffer (ChIP)	0,1 M NaHCO ₃ , 1% (w/v) SDS
EMSA-Puffer	25 mM HEPES pH 7,6, 15% (v/v) Glycerol, 60 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,01% (v/v) NP-40, 1x PIC
Entfärbelösung (Coomassie-Färbung)	10% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Methanol
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	0,04% (v/v) Formaldehyd, 2% (w/v) Natriumcarbonat
Extraktionspuffer A (Kernextraktion)	10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1x PIC
Extraktionspuffer B (Kernextraktion)	20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA,

5. Material und Methoden

Färbelösung (Coomassie-Färbung)	10% (v/v) Glycerol 0,016% (w/v) Brillantblau R-250, 20% (v/v) Isopropanol, 8% (v/v) Essigsäure
Färbelösung (Silberfärbung)	0,1% (w/v) Silbernitrat
Fixierlösung (IHC)	50% (v/v) Aceton, 50% (v/v) Methanol
Fixierlösung (Silberfärbung)	45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Fraktionierpuffer A (Salzgradient)	10 mM HEPES, 15 mM KCl, 2mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 40 U/ml RNAsin
Fraktionierpuffer B (Salzgradient)	10 mM HEPES, 2 mM MgCl ₂ , 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 420 mM NaCl, 0,5% (v/v) NP-40, 1 mM PMSF, 40 U/ml RNAsin
Fraktionierpuffer C (Kernfraktionierung)	10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,4% NP-40, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1xPIC
Fraktionierpuffer D (Kernfraktionierung)	20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1xPIC
Glycerolgradienten-Puffer	20 mM HEPES pH 7,9, 300 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,1% (v/v) NP-40
2xHBS Puffer, pH 7,05	273 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 54 mM HEPES
5xInkubationspuffer (CHIP)	100 mM HEPES pH 7,6, 0,75% (w/v) SDS, 5% (v/v) Triton X-100, 0,75 M NaCl, 5 mM EDTA, 2,5 mM EGTA
Kathodenpuffer pH 9,4 (Western-Blot)	25 mM Tris, 40 mM 6-Aminocaprinsäure, 20% (v/v) Methanol
Kinase-Puffer	100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM ATP
Laufpuffer A (Glycerolgradienten)	20 mM HEPES pH 7,9, 0,3 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,1% (v/v) NP-40, 1x PIC
Läemmlipuffer, 2x	100 mM Tris pH 6,8, 200 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau
Lysispuffer für Ganzzellextrakte	150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 0,4 mM EDTA, 1% (v/v) TritonX-100, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 1xPIC
Lysispuffer für Bakterien	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1% (v/v) TritonX-100, 5% (v/v) Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol
Release-Puffer	25 mM HEPES pH 7,6, 15% (v/v) Glycerol, 60 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,01% (v/v) NP-40
Sammelgelpuffer pH 6,8 (SDS/native PAGE)	1 M Tris pH 6,8

5. Material und Methoden

TBE-Puffer	100 mM Tris, 500 mM H ₃ BO ₃ , 2,5 mM EDTA
Trenngelpuffer pH 8,8 (SDS/native PAGE)	1 M Tris pH 8,8
Waschpuffer pH 8,0 (Ni-NTA-Agarose)	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Waschpuffer pH 8,0 (Strep-Tactin-Säulen)	100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Waschpuffer pH 8,0 (RNA-Bindung)	125 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl
Waschpuffer 1 (ChIP)	20 mM HEPES pH 7,6, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) NaDOC, 1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA
Waschpuffer 2 (ChIP)	20 mM HEPES pH 7,6, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) NaDOC, 1% (v/v) Triton X-100, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA
Waschpuffer 3 (ChIP)	20 mM HEPES pH 7,6, 250 mM LiCl, 0,5% (w/v) NaDOC, 0,5% (v/v) NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA
10xWaschpuffer 4 (ChIP)	200 mM HEPES pH 7,6, 10 mM EDTA, 5 mM EGTA

5.1.3. Verwendete Organismen/Medien

Bakterienstämme	Genotyp
OneShot ® BL21 star™ (DE3) JM109	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcm rne131</i> (DE3) <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ(<i>lac-pro AB</i>) F' (<i>traD36 proAB⁺ lac^qlacZΔm15</i>) <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80ΔlacZΔm15</i>
Top10	Δ <i>lacX74 deoR recA1 AraD139 Δ(ara,leu) 7697</i> <i>ga/U ga/K λ⁻ rspL (strep^R) endA1 nupG</i>
Medien	Zusammensetzung
TB _{amp} -Medium (<i>terrific broth</i>)	1,2% (w/v) Pepton, 2,4% (w/v) Hefeextrakt, 0,4% (v/v) Glycerol, 72 mM K ₂ HPO ₄ , 17 mM KH ₂ PO ₄ , 100 µg/ml Ampicillin
YT-Medium (<i>yeast triptone</i>)	1% (w/v) Bacto Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl
YT-Agar	YT-Medium +1,2% (w/v) Agar
YT _{amp} -Medium/Agar	YT-Medium/Agar +100 µg/ml Ampicillin
YT _{kan} -Medium/Agar	YT-Medium/Agar +25 µg/ml Kanamycin

Zell-Linien	DSMZ/ATCC-No.	Zelltyp (Referenz)
293T (HEK293T)	ACC 635	Humane embryonale Nierenzellen, Derivat der Linie 293 (ACC 305), trägt ein Plasmid mit der temperatursensitiven Mutante des SV-40 large T-anitgen (TSA1609neo); GMO-S1 (Rio et al., 1985)
HeLa	ACC 57	Humane Zervixkarzinomzellen, 1951 kultiviert aus epitheloiden Zervixkarzinom einer 31-jährigen Frau. Trägt eine HPV-18 Infektion mit mehreren Kopien des Provirus; das Genom trägt 2-3 kb Deletionen, Aktivierung und Transmission sind unwahrscheinlich. GMO-S1 (Gey et al., 1952; Scherer et al., 1953)
ARPE-19	CRL-2302™	Humane Retinapigmentepithelzellen, 1986 kultiviert von einem gesunden 19-jährigen Spender. GMO-S1 (Dunn et al., 1996)

Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgte bei 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit bei 37°C. Alle Zelllinien wurden in DMEM (High-Glucose, 4,5 g/l) kultiviert und mit 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin sowie 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin supplementiert.

5.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide aufgeführt. Dabei zeigen kapitalisierte Sequenzen die bindenden Abschnitte an, während kleingeschriebene Sequenzen zusätzliche, nicht-bindende Elemente darstellen. Start- und Stopp-codons sind fett geschrieben, Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, FW = *forward*/in 3'-Richtung, RV = *reverse*/in 5'-Richtung. Alle Oligonukleotide wurden als Auftragsynthese bei der Firma Eurofins (Luxemburg) bezogen.

Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz (5'-->3')
HEXIM1-FW	<u>gcgggatcc</u> ATG GCCGAGCCATTCTTGTCAG (BamHI)
HEXIM1-RV	ccg ctcgag CTAG TCTCCAACTTGAAAG (XhoI)
Tat-FW	<u>ggatcc</u> GCCACCATGGAGCCAGTAG (BamHI)

5. Material und Methoden

Tat-RV	<u>gaattc</u> GAACGGATCTGTCTCTGTCTCTCTCTCCACC (EcoRI)
AF4N-FW	<u>ggcctctgaggcc</u> ACC ATG GCAGCCCAGTCAAG (SfiI)
AF4N-RV	<u>ccgctcgag</u> AACTGACTGAGAAGGCATCT (XhoI)
CycT1-FW	<u>ggtctc</u> AACTC ATG GAGGGAGAGAGGAAG (BsaI)
CycT1-RV	<u>ggcctgacaggcc</u> TACTTAGGAAGGGGTGGAAGTG (SfiI)
HEXIM1-FW2	<u>ggtctc</u> AACTC ATG GCCGAGCCATTCTTGT (BsaI)
HEXIM1-RV2	<u>ggcctgacaggcc</u> CTAGTCTCCAACTTGAAAG (SfiI)
mTag-BFP-FW	<u>ggcctctgaggcc</u> ACC ATG AGCGAGCTGATTA (SfiI)
mTag-BFP-RV	<u>ggtctc</u> AGAGTCCGGAGTTCAGCTTGT (BsaI)
mTag-GFP2-FW	<u>ggcctctgaggcc</u> ACC ATG AGCGGGGCGAGGA (SfiI)
mTag-GFP2-RV	<u>ggtctc</u> AGAGTCCGGACCTGTACAGCT (BsaI)
CDK9-FW	<u>cgcgatcc</u> ATG GCAAAGCAGTACGACTCGGTGG (BamHI)
CDK9-RV	<u>ccgctcgag</u> GAAGACGCGCTCAAACCTCCGTCTG (XhoI)
dTom-FW	<u>tctaga</u> ATG TTGAGCAAGGGCGAGGA (XbaI)
dTom-RV	<u>gatatc</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGT (EcoRV)
BRLF1-FW	<u>cgcaagctt</u> ATG AGGCCTAAAAAGGATGGC (HindIII)
BRLF1-RV	<u>cgcgagccgc</u> CTAAATAAGCTGGTGTCAA (NotI)
BZLF1-FW	<u>cgcgatcc</u> ATG ATGGACCCAACTCGACT (BamHI)
BZLF1-RV	<u>ccgctcgag</u> GAAATTTAAGAGATCCTCGTG (XhoI)
IE1-FW	<u>cgcgatcc</u> ATG GAGTCCTCTGCCAAGAGA (BamHI)
IE1-RV	<u>ccgctcgag</u> CTGGTCAGCCTTGCTTCTAGT (XhoI)
IE2-RV	<u>cgcgagccgc</u> TGAGATTTGTTCTCAGGTCC (NotI)
E2-FW	<u>cgcgatcc</u> ATG GAGACTCTTTCTCAACG (BamHI)
E2-RV	<u>ccgctcgag</u> TATAGTCATATATCCTGTTGACACT (XhoI)
E8^E2C-FW	<u>cgcgatcc</u> ATG GCAATACTGAAGTGGAAC (BamHI)

E8 ^Δ E2C-RV	<u>ccgctcgag</u> AATAGTCATATATCCTGTTGACACTGA (XhoI)
E6/7-FW	cg <u>cggatcc</u> ATGC ACCAAAAGAGAACTGCAA (BamHI)
E6/7-RV	<u>ccgctcgag</u> TGGTTTCTGAGAACAGATGGG (XhoI)
E6-FW	cg <u>cggatcc</u> ATGC ACCAAAAGAGAACTGCAA (BamHI)
E6-RV	<u>ccgctcgag</u> CAGCTGGGTTTCTCTACGTG (XhoI)
E7-FW	cg <u>cggatcc</u> ATGC ATGGAGATACACCTACA (BamHI)
E7-RV	<u>ccgctcgag</u> TGGTTTCTGAGAACAGATGGG (XhoI)
E8-FW	cg <u>cggatcc</u> ATGG CAATACTGAAGTGG (BamHI)
E8-RV	<u>ccgctcgag</u> GTACCATCTGCTGCGTTT (XhoI)
ORF45-FW	cg <u>cggatcc</u> ATGG CTATGTTTTTAGACACTGAGGCA (BamHI)
ORF45-RV	<u>ggggccgc</u> TTAAGCCACGGCCAAACATAACA (NotI)
Rta-FW	cg <u>gaattc</u> ATGG CGCAAGATGACAAGGGTA (EcoRI)
Rta-RV	cg <u>cctcgag</u> GTCTCGGAAGTAATTACGCCA (XhoI)
ICP27-FW	cg <u>cggatcc</u> ATGG CGACTGACATTGATATGCTA (BamHI)
ICP27-RV	cg <u>cctcgag</u> AAACAGGGAGTTGCAATAAAAATATTT (XhoI)

Oligonukleotide als Linker

Name	Sequenz (5'-->3')
pDF-MCS-FW	<u>agcttggatccgaattc</u> cgggccgcctcgagtctagagatatcggtaccta <u>agggcc</u> (HindIII/ApaI)
pDF-MCS-RV	<u>cttaggtaccgatatctctagactcgaggcggccggaattcggatcca</u> (HindIII/ApaI)
FLAG®-Tag-FW	<u>atcgactacaaagacgatgacgacaagggtac</u> (EcoRV/KpnI)
FLAG®-Tag-RV	<u>cctgtcgtcatcgtctttgtagtcgat</u> (EcoRV/KpnI)
AF4-SfiI-FW	ggcctgtcaggcc (NotI/AvrII)
AF4-SfiI-RV	ctaggcctgaca (NotI/AvrII)
AF4-SfiI-FW2	<u>ctagaggcctctgaggccaccatggcagcccagtc</u> aagttt (XbaI/BsrGI)

AF4-Sfil-RV2 gtacaaacttgactgggctgccatggtggcctcagaggcct (XbaI/BsrGI)

Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

Name	Sequenz (5'-->3')
CDK9K44A-FW	AAGACCGGCCAGgcaGTGGCTCT (AAG->gca/K->A)
CDK9K44A-RV	AGAGCCACtgcCTGGCCGGTCTT
CDK9K4849A-FW	AGGTGGCTCTGgcGgcGGTGCTGAT (AAGAAG->gcGgcG/KK->AA)
CDK9K4849A-RV	ATCAGCACcgcCgcCAGAGCCACCT
CDK9K44R-FW	AAGACCGGCCAGAgGGTGGCTCT (AAG->AgG/K->R)
CDK9K44R-RV	AGAGCCACCcTCTGGCCGGTCTT
CDK9K4849R-FW	GTGGCTCTGAgGAgGGTGCTGATGG (AAGAAG->AgGAgG/KK->RR)
CDK9K4849R-RV	CCATCAGCACcTCcTCAGAGCCAC
CDK9T186A-FW	GCCCAACCGCTACgCCAACCGTGTGGTGACAC (ACC->gCC/T->A)
CDK9T186A-RV	GTGTCACCACACGGTTGGcGTAGCGGTTGGGC

Oligonukleotide für die quantitative PCR (qPCR)

Name	Sequenz (5'-->3')
GAPDH-FW	CTTCACCACCATGGAGGAAGG
GAPDH-RV	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
Actin-FW	ACCACGGGTCATCACCATTGG
Actin-RV	CACGGAGTACTTGCGCTCAG
AF4-FW	TTGCAATGCAGCAGAAGCC
AF4-RV	TTCAGTCACTGTCCTCACTGTC
7SKsnRNA-FW	AGGACCGGTCTTCGGTCAA
7SKsnRNA-RV	TCATTTGGATGTGTCTGCAGTCT

5.1.5. Vektoren und Plasmide

pTARGET: Dabei handelte es sich um den kommerziellen, konstitutiven Expressionsvektor für Säugerzellen des pTARGET™ *Mammalian Expression Vektor System* (Promega, Madison, USA, Cat. No. A1410). Dieser Vektor erlaubt die Insertion von PCR-Produkten ohne distinkte Restriktionsschnittstellen durch einen terminal überhängende Thymin-Base im linearisierten Zustand. Die Expression erfolgt über eine CMV-Promotor/Enhancer Region.

pTARGET-AF4/pTARGET-der4: Diese Vektoren waren eine freundliche Spende von Frau Dr. Adelheid Bursen, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main und sind bereits publiziert und beschrieben⁴⁸⁵.

pEXPR-IBA103: Dabei handelte es sich um den kommerziellen, konstitutiven Expressionsvektor für Säugerzellen des *One-STrEP-Tag® System* (IBA, Göttingen, Cat. No. 2-3505-000). Dieser Vektor fügt eine C-terminale Strep-Markierung an das zu exprimierende Protein an und erlaubt so die Affinitätsreinigung über das Strep-Tactin-System. Die Expression erfolgt über eine CMV-Promotor/Enhancer Region.

pEXPR-IBA103-AF4/der4: Diese Vektoren waren eine freundliche Spende von Frau Dr. Anne Benedikt, ehemals Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main und sind bereits publiziert und beschrieben⁴⁸⁶.

pGEX-5T: Dabei handelte es sich um den kommerziellen, induzierbaren Expressionsvektor für Prokaryoten des *pGEX System* (GE Healthcare, Pittsburgh, USA). Dieser Vektor wurde mittlerweile durch die pGEX-5X Serie ersetzt (Cat. No. 28-9545-53) und ist nicht mehr erhältlich. Wesentlicher Unterschied ist das Vorhandensein einer Factor Xa-Schnittstelle anstelle einer Thrombin-Schnittstelle. Er fügt eine N-terminale Histidin Hexapeptid- sowie eine GST-Markierung an das zu exprimierende Protein an und erlaubt so die Affinitätsreinigung über Glutathion- oder Ni-NTA-Matrizen. Die Expression erfolgt über einen IPTG-induzierbaren tac-Promotor.

pGEX-5T-CTD: Dieser Vektor war eine freundliche Spende von Frau Dr. Anne Benedikt, ehemals Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main und ist bereits publiziert und beschrieben⁴⁸⁶.

pGEX-5T-AF4N: Dieser Vektor war eine freundliche Spende von Frau Dr. Adelheid Bursen, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main und ist bereits publiziert und beschrieben⁴⁸⁵.

pGEX-5T-HEXIM1: Der aus cDNA amplifizierte offene Leserahmen (ORF) des humanen HEXIM1 (gemäß NCBI Referenz NM_006460.2, 1080 bp, mit Stop-Codon TAG) wurde über *BamHI/XhoI* in die MCS des pGEX-5T kloniert.

pGEX-5T-Tat: Der offene Leserahmen (ORF) des HIV-1 Tat (gemäß *GenBank* Eintrag M64491.1, 306 bp, mit Stop-Codon TGA) wurde über *BamHI/EcoRI* in die MCS des pGEX-5T kloniert.

HIV-1/TAR-Luciferase Reporterplasmid: Dieser Vektor war eine freundliche Spende von Dr. André Berger, ehemals Paul-Ehrlich-Institut, Langen, und ist bereits publiziert und beschrieben⁷⁵⁵.

pRL-SV40: Dabei handelte es sich um den kommerziellen, konstitutiven Expressionsvektor für die Renilla Luciferase als interne Kontrolle für Luciferase-abhängige Reportergerneversuche (Promega, Madison, USA, Cat. No. E2231).

pN10/pGL3cdsInJM: Diese Vektoren waren eine freundliche Spende von Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main und sind bereits publiziert und beschrieben^{725,726}.

pITR-EZP (EF1 α /ZsGreen/Puromycin-Resistenz): Dieser Vektor ist ein konstitutives Expressionsplasmid, dessen durch die ITRs (*inverted tandem repeats*) definierte Expressionskassette (Transposon) über das *Sleeping-Beauty Transposase* System stabil in das Genom integriert werden kann. Die Expression des GOI erfolgt über einen EF1 α -Promotor (**E**) in Kombination mit einer SV40 polyA-Sequenz. Die Insertion des GOI erfolgt über distinkte *SfiI* Schnittstellen. Weiterhin codiert die Integrationskassette in einem getrennten ORF für das ZsGreen Protein (**Z**) als Transfektionsreporter sowie für die Puromycin *N*-acetyl-transferase (**P**) als Selektionsmarker, deren Expression über einen PGK-Promotor gesteuert wird. Beide Proteine sind nach der Translation über ein 2A-Peptid verbunden und werden post-translational proteolytisch getrennt. Dieser Vektor und alle weiteren pITR-Vektoren ohne GOI waren eine freundliche Spende von Dr. Eric Kowarz, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.

pITR-EZP-bGH: Dieser Vektor ist analog zu pITR-EZP, enthält jedoch anstelle der SV40-polyA Sequenz eine *bovine growth hormone*-polyA Sequenz, welche die mRNA des GOI stärker stabilisiert und so die Genexpression erhöht⁷⁵⁶.

pITR-ETP: Dieser Vektor ist analog zu pITR-EZP, enthält jedoch anstelle des ZsGreen Reporterprotein ein dTomato Reporterprotein.

pITR-TCZP: Dieser Vektor ist analog zu pITR-EZP, enthält jedoch anstelle des EF1 α -Promotors einen durch Doxycyclin induzierbaren TRE2-Promotor (**T**) sowie einen CMV-Enhancer strangabwärts der polyA Sequenz. Weiterhin wurde zur Kontrolle des TRE2-Promotors ein rtTA2S-M2 (optimierter *reverse tet transactivator*) Element⁷⁵⁷, ebenfalls durch das 2A-Peptid verbunden, in das ZsGreen/Puromycin *N*-acetyl-transferase ORF eingefügt.

pITR-EZP/EZP-bGH/TCZP-AF4ST: Für die Insertion des AF4 ORF mit C-terminaler Strep-Markierung (AF4ST) wurde diese Sequenz aus dem pEXPR-IBA103-AF4 durch Einbringung zweier distinkter *SfiI* Erkennungssequenzen unmittelbar strangauf- (über *XbaI/BsrGI*) und strangabwärts (über *NotI/AvrI*) mittels Oligonukleotid-Linker mobilisiert. Der modifizierte pEXPR-IBA103-AF4 2x*SfiI* Vektor wurde dann über *SfiI* geöffnet und das isolierte ORF AF4ST in die pITR Vektoren eingesetzt.

pITR-EZP-AF4NST: Die Sequenz des AF4 N-Terminus wurde mittels PCR und zweier synthetischer Oligonukleotide mit entsprechend angefügten *SfiI/XhoI* Erkennungssequenzen aus dem pGEX-5T-AF4N als Matrize heraus amplifiziert und restriktionsverdaut. Der Vektor pITR-TCZP-AF4ST wurde analog verdaut. Eine *XhoI* Erkennungssequenz zwischen AF4 ORF und der strangabwärts liegenden Strep-Markierung erlaubte die Einführung des AF4N Amplifikats unter Erhalt der Strep-Markierung.

pITR-EZP-AF4mC: Der ORF für ein C-terminal mit dem mCherry Protein markiertes AF4 und den entsprechenden *SfiI* Erkennungssequenzen war eine freundliche Spende von Herrn Fabian Mück, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main. Der restriktionsverdaut ORF wurde in den pITR-EZP eingesetzt.

pITR-ETP-GFPHEXIM1/BFPcycT1: Der aus cDNA amplifizierte offene Leserahmen (ORF) des humanen HEXIM1 (gemäß NCBI Referenz NM_006460.2, 1080 bp, mit Stop-Codon TAG) oder des humanen CycT1 (gemäß NCBI Referenz NM_001240.3, 2178 bp, mit Stop-Codon TAA) wurde am jeweiligen 5'-Ende durch PCR mit einer *BsaI* und am 3'-Ende mit einer *SfiI* Erkennungssequenz versehen. Gleichsam wurden die ORF des mTagBFP⁷⁵⁸ bzw. des mTagGFP2^{758,759} jeweils am 5'-Ende mit einer *SfiI* und am 3'-Ende mit der *BsaI* Erkennungssequenz versehen. Die Amplifikate wurden restriktionsverdaut und über die *BsaI* Schnittstelle mittels einer Ligationsreaktion zu mTagBFP-CycT1 und mTagGFP2-HEXIM1 fusioniert. Anschließend wurden die Fusionen über *SfiI* in den pITR-ETP inseriert.

SB100xco: Vollständig "pcGlobin SB100xco". Dieser Vektor war eine freundliche Spende von Dr. Zoltán Ivics, Paul-Ehrlich-Institut, Langen und ist bereits publiziert und beschrieben⁷⁶⁰. Er dient als Expressionsplasmid für die hyperaktive Transposase zwecks Integration der Transposons aus den pITR-Vektoren (s.o.).

pCMV-dR8.91/pMD2.G: Beide Plasmide waren eine freundliche Spende aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main. Der pCMV-dR8.91 ist ein Verpackungsplasmid der zweiten Generation und codiert für alle HIV-1 Gene mit Ausnahme des Envelops sowie der Hilfgene wie *vpr*, *vpu*, *nef* etc.. pCMV-dR8.91 ist bereits beschrieben und publiziert⁷⁶¹. pMD2.G ist der Expressionsvektor für den Envelop und stammt ursprünglich aus dem Labor von Didier Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Schweiz), er entspricht dem *Addgene*-Plasmid 12259.

shRNA-AF4: Es handelte sich hierbei um das validierte, kommerzielle lentivirale shRNA-Plasmid pLKO.1-puro der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Es wurde der Klon NM_005935.1-3999s1c1 (shRNA-Sequenz 5'-CCGGGCACTA TACACGACAG GGGTTTCTCGA GAAACCCTGT CGTGTATAGT GCTTTTT-3' in der CDS, TRC-Nummer: TRCN0000021976) eingesetzt.

pDF: Der pDF Vektor ist eine modifizierte Version des kommerziellen Expressionsvektors pcDNA3 für Säugerzellen der Marke Invitrogen™ (Life Technologies, Paisley, UK). Dazu wurde über die Schnittstellen *HindIII/ApaI* der ursprünglichen Multiplen Klonierstelle durch ein synthetisches Oligonukleotid eine neue Multiple Klonierungsstelle (*HindIII-BamHI-EcoRI-NotI-XhoI-XbaI-EcoRV-KpnI-TGA(Stop)*) eingefügt und in diese anschließend über *EcoRV/KpnI* die FLAG®-Markierung ebenfalls über ein synthetisches Oligonukleotid inseriert. Dieser Vektor erlaubt durch die Vielzahl an möglichen Kombinationen von Restriktionsenzymen die Klonierung aller viralen ORF in einen einheitlichen Expressionsvektor und fügte gleichzeitig eine C-terminale FLAG®-Markierung zwecks Detektion und Immunpräzipitation an.

pDF-CDK9/CDK9 Mutanten: Der aus cDNA amplifizierte offene Leserahmen (ORF) des humanen CDK9 (gemäß NCBI Referenz NM_001261.3, 1118 bp) wurde über *BamHI/XhoI* in den pDF inseriert. Alle Mutanten entstanden durch zielgerichtete Mutagenese mit den entsprechenden Oligonukleotiden.

pDF-IE Proteine: Alle ORF der verwendeten viralen IE-Proteine wurden mittels PCR aus den entsprechenden gespendeten Vektoren amplifiziert und mit Erkennungssequenzen geeigneter Restriktionsenzyme versehen. Die Amplifikate wurden anschließend restriktionsverdaut und in die Multiple Klonierungsstelle des pDF eingefügt. Die entsprechenden Enzyme waren: *HindIII/NotI* (BRLF1), *BamHI/XhoI* (BZLF1/IE1/E2/E8^ΔE2C/E67/E6/E7/E8/ORF45/ICP27), *BamHI/NotI* (IE2) sowie *EcoRI/XhoI* (Rta). HCMV IE1 und IE2 könne aufgrund des identischen ersten Exons am 5'-Ende mit dem gleichen Oligonukleotid amplifiziert werden. Die Plasmide mit den ORFs waren freundliche Spenden von Herrn Prof.

Dr. Dieter Steinhilber vom Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (HCMV IE1, IE2), Herrn Prof. Dr. Georg Wilhelm Bornkamm, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Helmholtz Zentrum München (EBV BZLF1, BRLF1), Herrn Prof. Dr. Thomas Iftner, Sektion Experimentelle Virologie, Universitätsklinikum Tübingen (HPV16 E-Proteine), und Herrn Dr. Frank Neipel, Virologisches Institut - Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen (HHV8 Rta, KSHV ORF45 und HSV-1 ICP27).

pDTF/pDTF-IE1: Der pDTF war eine modifizierte Variante des pDF, die N-terminal der C-terminalen FLAG®-Markierung eine direkt fusionierte dTomato-Markierung trägt. Dazu wurde das dTomato Fragment mittels PCR aus dem pITR-ETP heraus amplifiziert und über *XbaI/EcoRV* in die Multiple Klonierungsstelle des pDF eingefügt, dies geschah analog für den pDF-IE1. Alle durch den pDTF exprimierten Proteine tragen damit eine direkte dTomato-FLAG® Markierung, sind also fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.

5-LO Plasmid: Das Expressionsplasmid für die vollständige Arachidonat-5-Lipoxygenase war eine freundliche Spende aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.

5.1.6. Antikörper

Primäre Antikörper:

Bezeichnung	Verdünnung (WB/IHC)	Beschreibung
Anti-5-LO	-/1:100	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen das interne synthetische Peptid AS 130-149 der humanen 5-LO (Cayman Chemical)
Anti-AF4 (S-17)/(V-14)	1:500/1:100	Ziege polyklonale Antikörper gegen ein N-terminales synthetisches Peptid des humanen AF4 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-CDK9 (C-20)	1:500/-	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid des C-Terminus des humanen CDK9 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-CDK7 (C-19)	1:500/-	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid des C-Terminus des humanen CDK7 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-CMV IE1	-/1:100	Maus monoklonaler Antikörper gegen das 55 kDa HCMV IE1 Protein (Acris Antibodies)
Anti-CYCLIN T1 (H-245)	1:500/-	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen das

5. Material und Methoden

		interne synthetische Peptid AS 261-505 des humanen CYCLIN T1 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-HEXIM1	1:1000/-	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen das C-terminale synthetische Peptid AS 300-359 des humanen HEXIM1 (Abcam)
Anti-LARP7	1:1000/-	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen das C-terminale synthetische Peptid AS 533-582 des humanen LARP7 (Abcam)
Anti- β -ACTIN (I-19)	1:1000/-	Ziege polyklonaler Antikörper gegen ein C-terminales synthetisches Peptid des humanen AKTIN (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-NF κ B p65/p50	1:1000/-	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen das C-terminale synthetische Peptid AS 532-551 des humanen NF κ B p65 (Abcam)
Anti-Acetyl-Lysin	1:1000/-	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid welches acetylierte Lysine trägt (Cell Signalling Technology)
Anti-Acetyl-Histon H3	k.A.	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen den acetylierten N-Terminus des humanen Histon H3 (Millipore)
Anti-FLAG M2	1:1000/-	Maus monoklonaler Antikörper gegen das synthetische FLAG-Peptid DYKDDDDK (Sigma)
Anti-Rabbit IgG	k.A.	Kaninchen IgG als Negativkontrolle in den ChIP-Experimenten (Millipore)
Unspezifischer IgG	k.A.	Kaninchen/Ziege/Maus IgG als Negativkontrolle für diverse Experimente (Santa Cruz Biotechnology)

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Beschreibung
Anti-Goat HRP Konjugat	1:10000	Mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Ziege-IgG (Vector Laboratories)
Anti-Mouse HRP Konjugat	1:10000	Mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG (GE Healthcare)
Anti-Rabbit HRP Konjugat	1:10000	Mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (GE Healthcare)

IRDye® 800CW Anti-Rabbit	1:100	Mit IRDye® 800CW gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Li-Cor)
IRDye® 800CW Anti-Goat	1:100	Mit IRDye® 800CW gekoppelter Antikörper gegen Ziege-IgG (Li-Cor)

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Standardmethoden

Im Folgenden werden die durchgeführten allgemeinen molekularbiologischen Methoden aufgeführt. Deren Durchführung erfolgte gemäß den gängigen Protokollsammlungen oder Herstellerangaben und wird daher in dieser Arbeit nicht im Detail beschrieben (vgl. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol.3/4* von Sambrook *et al.*, 2000/2012).

- Auffüllreaktionen an überhängenden Enden der DNA (*fill-in*)
- Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA mittels alkalischer Phosphatase
- Elektroporation von *E.coli* Bakterien
- Extraktion von Gesamt-RNA aus eukaryoten Zellen (mittels *RNeasy® Mini Kit* von QIAGEN)
- Fällungsmethoden für Nukleinsäuren (Alkoholisch/Phenol-Chloroform)
- Gelelektrophoresen mit Agarose (DNA) und Acrylamid (Proteine)
- Gelextraktion von DNA (mittels *QIAquick® Gel Extraction Kit* von QIAGEN)
- Herstellung von CaCl₂- und Elektroporations-kompetenten *E.coli* Bakterien
- Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden
- Induktionskinetiken für die Expression rekombinanter Proteine aus *E.coli*
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (mittels *Pure Yield™ Plasmid MaxiPrep System* von Promega)
- Ligation von DNS mittels T4 DNA-Ligase
- Minilysat Präparation von Plasmid-DNS aus *E.coli* mittels alkalischer Lyse
- PCR Analysen
- Phosphorylierung von 5'-Enden der DNS mittels T4 Polynukleotidkinase

- Photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA/Proteinen
- Reverse Transkription von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase (Invitrogen)
- Spaltung von DNA mit diversen Restriktionsenzymen (New England Biolabs)
- Transformation von *E.coli* mittels CaCl_2 (*heat-shock*)
- Western Blot (Semi-dry; z.T. Trans-Blot® TURBO™ von Bio-Rad)
- Zielgerichtete Mutagenese (*QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* von Agilent Technologies)

5.2.2. Sequenzanalysen

Alle DNS-Sequenzierungen wurden mit dem *ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* gemäß der Herstelleranleitung durchgeführt. Methodische Grundlage ist die Sequenzierung per Kettenabbruchmethode. Nach chromatographischer Auftrennung ermöglicht sie eine auf vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Signalen basierende Sequenzierung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA im ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer.

5.2.3. Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR wurde unter Verwendung des *StepOne Plus System* von Applied Biosystems durchgeführt. Die Detektion der Amplifikate erfolgte über die Interkalation von SYBR Green I (*Power® SYBR Green*, Applied Biosystems) in die DNA. Die relative Quantifizierung erfolgte durch Anwendung der vergleichenden CT-(*cycle threshold*) Methode ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$), als Referenzgen diente β -Actin/GAPDH, Basis der Vergleichs waren stets mit Leervektor transfizierte Zellen. Für die Standardkurve im Falle der absoluten Quantifizierung der 7SK snRNA oder von β -Actin mRNA wurden 10^1 bis 10^8 Kopien je im Triplikate eingesetzt und anschließend mittels linearer Regression die Kopienzahl in den Proben errechnet. Das Standardprotokoll der qPCR war

95°C	10 min.	Initiale Denaturierung	} 40 Zyklen
95°C	15 sec.	Aufschmelzen	
60°C	1 min.	Transkription	
95°C	15 sec.	Aufschmelzen	
60°C	1 min.	Transkription	
95°C	15 sec.	Schmelzpunktbestimmung	

Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 25 μ l in 1x *SYBR Green PCR Master Mix* unter Zugabe von 1,5 μ l umgeschriebener cDNA und je 5 pmol der Oligonukleotide statt.

5.3. Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte als sequentielle Tandemaufreinigung zwecks Reinheit und Spezifität der Proteine für anschließende *in-vitro* Versuche. Zur Expression sämtlicher rekombinanter Proteine wurden deren kodierende Sequenzen in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX5T kloniert. Dieser fusioniert an den N-Terminus des Proteins eine Histidin-hexapeptid- und eine Glutathion-S-Transferase-Markierung, zusätzlich erlaubt er eine durch die Zugabe von IPTG induzierbare Expression. Die Expressionsvektoren wurden 24 h vor der Produktion in den Bakterienstamm *E.coli* OneShot® BL21 star™ (DE3) transformiert und die Bakterien nach dem Ausplattieren auf YT_{amp}-Agar selektioniert. Ein vereinzelter, resistenter Klon wurde zum Animpfen einer 50 ml Vorkultur YT_{amp}-Medium verwendet und für 16 h bei 180 rpm und 37°C bis zur stationären Phase inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 25 ml in eine 1 l TB_{amp}-Medium Hauptkultur überimpft und diese in einem Schikanenkolben für ca. 1 h bei 30°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die induzierte Kultur wurde dann für weitere 3 h unter den genannten Bedingungen inkubiert und anschließend geerntet.

Zum Ernten wurde die Kultur bei 5000 rpm, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden in 3 ml/mg Lysepuffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 30 min. auf Eis lysiert. Anschließend wurde die Suspension unter Kühlung im Eisbad für 6x10 Sekunden mit einer Amplitude von 50% am Ultraschall homogenisiert. Das Homogenisat wurde einem DNS-Verdau für 15 min. bei 4°C unterzogen um die Viskosität der Proben zu erniedrigen. Bei Bedarf wurde danach erneut 2x10 Sekunden homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min. bei 4°C und 10000 rpm zur Abtrennung des Zelltrümmers. Anschließend wurde der Überstand für 1h einer Ultrazentrifugation bei 4°C und 35000 rpm unterzogen. Der dadurch produzierte Überstand diente als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung.

Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte mittels des Histidin-hexapeptides über einen 50% Ni-NTA-Agaroseharz bei konstanten 4°C. Dazu wurde 1 ml des Harzes in eine Einwegchromatographiesäule gegeben und für 5 min. abgesetzt. Der Überstand wurde abgelassen und das Harz durch Durchlaufen von 10 ml Lysepuffer äquilibriert. Anschließend wurde das homogenisierte Bakterienlysate aufgegeben, die Säule mit Deckel und Parafilm versiegelt und unter Rotation für 1 h inkubiert. Nach Absetzen des Harzes wurde der Überstand abgelassen und dreimal per Durchfluss mit 5 ml Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte die Elution des gebundenen Proteins in vier Elutionen mit je 500 μ l Elutionspuffer per

Durchfluss. Die Elutionsfraktionen 2 bis 4 wurden vereinigt und dienten als Ausgangsmaterial für den zweiten Aufreinigungsschritt. Zur präzisen Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben unter Verwendung folgender Parameter an einem Nanophotometer vermessen (Nanophotometer P330 von Implen, *Nano Application* Protein-UV, Lid 10, *custom*)

Protein	Molekulargewicht [Da]	ϵ [cm⁻¹ M⁻¹]
6xHis-GST	29019	42860
6xHis-GST-AF4N	66653	53290
6xHis-GST-HEXIM1	68251	82280
6xHis-GST-[YSPTSPS] _{2x}	30115	45840
6xHis-GST-Tat	39427	57300

Für die Reinigung mittels magentischer Gluthathion-Sepharose *Beads* wurden 500 µg der Proteine verdünnt in 500 µl Bindungspuffer eingesetzt. Entsprechend der Bindungskapazität der *Beads* (10 mg/ml) wurden 50 µl derselben verwendet, die vorgehend dreimal in 300 µl Bindungspuffer äquilibriert wurden. Nach Zugabe der Proteine wurde die Suspension zur Bindung für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert und anschließend dreimal mit 300 µl Bindungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution in zwei Fraktionen (200 µl+100 µl) mit Elutionspuffer für 5 min. bei Raumtemperatur. Die Elution-Fraktionen wurden vereinigt und mit 1 mM Natriumazid und 1xPIC versetzt. Die Konzentration wurde wie beschrieben vermessen und die Reinheit mittels 12% SDS-PAGE o. 12% nativer PAGE und anschließender Silberfärbung (siehe 5.5.12.) geprüft.

5.4. Arbeiten mit Säugerzellen

5.4.1. Transfektion

5.4.1.1. Transfektion von 293T/ARPE-19 Zellen mittels Polyethylenimin (PEI)

293T/ARPE-19 Zellen wurden zu einer Konfluenz von ~50% ausgebracht und für 24 h Adhärenz ausbilden lassen. 2-3 h vor der Transfektion wurde das Medium erneuert. Um die zu transfizierende Plasmid-DNA für die Endozytose vorzubereiten wurden zwei separate Lösungen hergestellt:

Lösung A: 3,6 µl 10 mM PEI pro µg Plasmid-DNA wurden 1:5 in 1xPBS verdünnt

Lösung B: totale Plasmid-DNA, mit 1xPBS auf obiges Volumen aufgefüllt

Lösung B wurde tröpfchenweise unter Vortexen in Lösung A pipettiert und danach für weitere 30 Sekunden unter vortexen. Anschließend wurde das Gemisch für 15 min. bei RT inkubiert und gleichmäßig tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. 16 h nach der Zugabe wurde das Medium wieder erneuert.

5.4.1.2. Transfektion von HeLa/293T Zellen mittels Calciumphosphat

In dieser Arbeit wurde die Transfektion mittels Calciumphosphat für HeLa Zellen ausgewählt, da diese Methode erheblich bessere Transfektionseffizienzen erzielte als die Transfektion mit PEI. 293T Zellen wurden nur im Falle des lentiviralen *knock-down* mit Calciumphosphat transfiziert. HeLa Zellen wurden zu einer Konfluenz von 60-70% ausgebracht und für 24 h Adhärenz ausbilden lassen. 2-3 h vor der Transfektion wurde das Medium erneuert. Zur Bildung der Mikropräzipitate zwischen Calciumionen, Phosphat und der Plasmid-DNS wurden zwei separate Lösungen vorbereitet:

Lösung A: 500 µl 2xHBS-Puffer

Lösung B: 10 µg Plasmid-DNS, 61 µl 2M CaCl₂ ad 500 µl MQ-Wasser

Lösung B wurde tröpfchenweise in die durch Luftzuführung turbulente Lösung A pipettiert und danach für weitere 30 Sekunden unter vortexen. Anschließend wurde das Gemisch für 1 min. bei RT inkubiert und gleichmäßig auf die Zellen gegeben. 16 h nach der Zugabe wurde das Medium wieder erneuert.

5.4.2. Messung der Zellproliferation/Wachstumskurven

Je $5 \cdot 10^2$ 293T/HeLa Zellen wurden in beschriebenem Medium eine Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät. Die Inkubation erfolgte für 10 Tage in Anwesenheit von 1 µg/ml Doxycyclin (pITR-TCZP-AF4ST Konstrukt) oder 1 µg/ml Puromycin (AF4 *knockdown* Zelllinie) bzw. mit DMSO Kontrollen in den Kontrollzellen. Alle 24 h wurde ein Messpunkt im Triplikat genommen; dazu wurde das Medium erneuert und nach Herstellerangabe mit 10% (v/v) WST-8 versetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurde die optische Dichte bei 450 nm vermessen. Alle Werte verstehen sich abzüglich Blindprobe, dargestellt +/- S.E.M.

5.4.3. Herstellung von Zelllysaten/Fraktionen

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten als auch fraktionierten Lysaten wurden die Zellen bei Bedarf mit einem Zellschaber abgelöst und in 1xPBS aus der Kulturschale geerntet. Die Zellsuspensionen wurden für 5 min. bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets anschließend erneut in kaltem 1xPBS resuspendiert, ggf. die Zellzahl

bestimmt sowie in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Suspensionen wurden für weitere 5 min. bei 4000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die so erhaltenen Zellpellets dienten als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Lysate.

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellpellets in einem geeigneten Volumen des Lysepuffers resuspendiert, für 1 Stunde bei 4°C rotiert und anschließend für 30 min. bei 4°C, 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand aus dieser Zentrifugation ist das Gesamtzelllysat.

Zur Herstellung von Zytosol- und Kernfraktionen wurden die Zellpellets in Fraktionierpuffer C resuspendiert und für 10 min. bei RT inkubiert. Die Suspension wurde für 3 min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand als Zytosol-Fraktion aufbewahrt. Die Kernpellets wurden anschließend in Fraktionierpuffer D resuspendiert und für 2 Stunden bei 4°C stark geschüttelt (unter vortexen). Die Suspension wurde dann für 5 min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand als Kernfraktion aufbewahrt. Das Pellet wurde verworfen.

Die Salzfractionierung der Zellen erfolgte gemäß Fujinaga *et al.*⁷²⁴ unter Verwendung der Fraktionierpuffer A und B. Die Normierung der Lysate/Fractionen erfolgte entweder über die geerntete Zellzahl oder durch photometrische Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration über Bestimmung der A_{280} gegenüber einer BSA-Referenz mit dem jeweiligen Puffer als Leerkontrolle (Nanophotometer P330 von Implen, *Nano Application* Protein-UV, Lid 10, BSA).

5.4.4. Herstellung und Charakterisierung stabil AF4-exprimierender Zelllinien mittels *Sleeping-Beauty* Vektorsystem

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden 9,5 µg der entsprechenden Expressionsplasmide pITR-EZP-AF4ST, pITR-EZP-BGH-AF4ST oder pITR-TCZP-AF4ST zusammen mit 0,5 µg des Expressionsvektors der *Sleeping-Beauty* Transposase (SB100Xco) in 2×10^6 293T Zellen transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf das Vorhandensein des ZsGreen-Reporterproteins hin geprüft und im Falle grüner Fluoreszenz für 16-24 Stunden durch Zugabe von 0,5-1 µg/ml Puromycin in das Kulturmedium selektioniert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und folgende Selektion wurde so lange wiederholt (i.d.R. 2-3 mal), bis eine vollständig homogene, grün-fluoreszierende Zellpopulation erhalten wurde. Die Fluoreszenz wurde regelmäßig in jeder Passage geprüft und im Falle nachlassender Homogenität wie oben beschrieben nachselektioniert.

Zur Charakterisierung der Zelllinien wurde in drei unabhängigen Passagen, ggf. nach Induktion der Expression durch 48-stündige Gabe von 1 µg/ml Doxycyclin in das Kulturmedium im Falle des pITR-TCZP-AF4ST Konstrukts, die Gesamt-RNA extrahiert, revers in cDNA transkribiert und durch quantitative PCR die relative Menge an AF4 mRNA

bestimmt. Zusätzlich wurden aus Zellen der gleichen Passagen Gesamtzelllysate hergestellt und mittels 10%iger SDS-PAGE und Western-Blot auf die Menge an AF4, β -Actin und der Transposase hin untersucht. Für die Expressionskinetik in (B) wurden die Zellen 6, 24, 48 und 72 Stunden nach oben beschriebener Induktion der Expression mit 1 oder 3 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin geerntet und analog auf die Anwesenheit der genannten Proteine hin untersucht.

5.4.5. *In-vitro* Fluoreszenzmikroskopie/Durchlichtmikroskopie

Sämtliche (Fluoreszenz-)mikroskopischen Arbeiten und Dokumentationen wurden an einem Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen) unter Verwendung der *Velocity Analysis Software* (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die entsprechenden Filtersätze ("*Brightline*" Serie, Semrock, Rochester, USA) waren:

Fluorophor	λ_{max}-Excitation./Breite [nm]	λ_{max}-Emission/Breite [nm]	Filter
DAPI/BFP	377/50	447/60	DAPI HC
mCherry/RFP	562/40	641/75	mCherry HC
EGFP	466/40	525/50	EGFP HC

Die Belichtungszeiten der einzelnen Kanäle und die dargestellte Vergrößerung sind jeweils angegeben. Alle Bildausschnitte sind repräsentativ für das Gesamtbild und bilden ein in Einzelversuch vergleichbar großes Areal ab. Zur besseren Visualisierung wurden die Bilder wenn angegeben als hochauflösendes TIFF (*Tagged Image File Format*) aus der *Velocity Analysis Software* exportiert und *in silico* absolut uniform nachbearbeitet. Da es sich nicht um fixierte Zellen handelte, wurde zur Erzeugung scharfer Kanten sowohl Kontrast und Helligkeit um 50% erhöht. Anschließend wurden durch farbspezifischen Filter die Farbinformationen der entsprechenden Kanäle bereinigt in Graustufen dargestellt, wobei die Helligkeit mit der Farbintensität korreliert. So stellt beispielsweise ein blau-spezifischer Filter die Bildpunkte nach Subtraktion aller anderen Farbinformationen dar, wobei die (Weiß-)Intensität in diesem Fall nur durch die Intensität der Blaufärbung des Bildpunktes bestimmt wird. Dazu wurde eine professionelle Bildbearbeitungssoftware eingesetzt (*Adobe® Photoshop® CS3*, Adobe Systems Inc, USA; *Image>Adjustments>Black&White>Filter Preset*).

5.4.6. Lentiviraler *knock-down* des AF4 Proteins

Der lentivirale *knock-down* wurde mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Khalil Ahmad in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dieter Steinhilber am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, durchgeführt. Dazu wurden je 6×10^4 293T Zellen/Kavität in 24-Kavitäten Zellkulturschalen ausgesät und für ca. 24 Stunden bis zu einer 80%igen Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels

Calciumphosphat-Methode mit den Verpackungsplasmiden pCMV-dR8.91 und pMD2.G bzw. den shRNA codierenden Plasmid *MISSION® shRNA Plasmid* (Clone ID NM_005935.1-3282s1c1) transfiziert. Dazu wurden pro Zellkulturschale 10 µg des shRNA Plasmids sowie 6,5 µg des pCMV-dR8.91 und 3,5 µg des pMD2.G in einem Reaktionsansatz vermischt und anschließend auf die Kavitäten verteilt. Die Endkonzentration war entsprechend 417 ng shRNA Plasmid, 271 ng pCMV-dR8.91 und 146 ng pMD2.G je Kavität. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgte eine Medienwechsel. Nach 72 Stunden wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die viralen Partikel über einen 0,22 µm Filter von Zelltrümmern isoliert. Der so gewonnene Überstand wurde für die Transduktion der HeLa Zellen verwendet. Dazu wurden die HeLa-Zellen analog zu den 293T Zellen ausgesät, unmittelbar vor der Transduktion mit 4 µg Protaminsulfat behandelt und in je 6 Kavitäten mit 10, 50 oder 100 µl des Überstands versetzt. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurden der Virusüberstand auf den Zellen für 1,5 Stunden bei 32°C, 2500 rpm zentrifugiert (*Spin Transduction*). Nach weiteren 4 Stunden Inkubation wurde mit Zellkulturmedium auf 200 µl je Kavität aufgefüllt und nach weiteren 72 Stunden erfolgte ein Erneuerung des Mediums. Abschließend wurden die Zellen durch dauerhafte Zugabe von 1 µg/ml Puromycin ins Kulturmedium so lange selektioniert, bis kein Absterben der Zellen mehr zu beobachten war. Aus den Zellen wurde zur Charakterisierung RNA als auch Gesamtzelllysate gewonnen und mittels qPCR und ELISA auf die Menge an AF4 Protein und mRNA getestet.

5.4.7. FACS

Die FACS-Analysen wurden mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Tefik Merovci in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manuel Grez am "Institute for Biomedical Research Georg-Speyer-Haus", Frankfurt am Main, durchgeführt. Je 1×10^7 293T Zellen wurden 48 Stunden vor der Sortierung in den beschriebenen Kombinationen zu gleichen Teilen mit insgesamt 25 µg der Expressionsplasmide pDTF, pDTF-IE1, pTARGET und pTARGET-AF4 transient transfiziert und unmittelbar vor dem Sortieren in 5 ml Kulturmedium geerntet. Die Zellen wurden gezählt sowie deren Vitalität bestimmt und die maximale Zahl Lebendzellen (ca. 4×10^7 Zellen) für 3 min. bei RT, 1000 rpm zentrifugiert, in 1xPBS aufgenommen und direkt zum Sortieren übergeben. Die Sortierung erfolgte in drei Schritten: (1) FSC-A (*Forward Scatter-area*) gegen SSC-A (*Sideward Scatter-area*) zur Isolierung lebender Zellen korrekter Morphologie und Struktur (**P1**), (2) FSC-A gegen FSC-H (*Forward Scatter Height*) zum Aussortieren von Zelldoubletten (**P2**) und (3) PE-A (*Phycoerythrin-area*) (als Messgröße für die rote Fluoreszenz des dTomato Proteins) gegen SSC-A zur Isolierung von Zellen mit einer Mindestfluoreszenz von 1500 relativen Einheiten (**P3**). Die schlussendlich erhaltenen Zellpopulationen wurden gezählt und aus der maximalen Anzahl von Lebendzellen (ca.

5×10^4 bis 1×10^5 Zellen) die Gesamt-RNA extrahiert und deren Konzentration bestimmt. Die Darstellung erfolgte als Nanogramm RNA pro 1000 sortierter 293T Zellen.

5.4.8. Immunhistochemische Analyse transfizierter ARPE-Zellen

Je 6×10^4 ARPE Zellen wurden auf Objektträgern in Mikrozellkulturkammern (*chamber slides*) ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die transiente Transfektion von insgesamt 2 µg Plasmid-DNA/Kammer zu gleichen Teilen mit den Expressionsplasmiden pDF, pDF-IE1, pTARGET und pTARGET-AF4. Nach 24 Stunden wurden die Zellen je Kammer mit 1 ml kaltem Aceton/Methanol (1:1) für 20 min. bei RT fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt und die fixierten Zellen für 30 min. bei RT zum Blockieren unspezifischer Bindungen mit Blockierpuffer (IHC) inkubiert. Nach dem Entfernen des Blockierpuffers wurden die Zellen mit dem Primärantikörper für die 5-LO, AF4 oder HCMV IE1 (1:100 verdünnt in 0,3% Ziegen Serum/0,1% Tween 20 in 1xPBS) bei 4°C für 16 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal für 5 min. in PBS+0,1% Tween 20 gewaschen und anschließend der entsprechende Zweitantikörper analog zum Erstantikörper verdünnt aufgegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT und anschließend erneut drei Waschschrte (s.o.). Abschließend wurden die Zellen mit VECTASHIELD® *Mounting Medium* gemäß Herstellerangaben behandelt, DAPI-gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

5.5. Biochemische Arbeiten

5.5.1. *in vitro* Phosphorylierungsversuche

Die *in vitro* Phosphorylierungsversuche wurden mit affinitätsgereinigten AF4 und AF4-MLL MPCs (siehe 5.5.5.) sowie einem rekombinanten 6xHis-GST-[YSPTSPS]_{2x} Protein durchgeführt. Dazu wurden je 20 µl (**A**) der in Kinase-Puffer umgepufferten Eluate einer Affinitätsreinigung des AF4 oder AF4-MLL MPC mit einem Überschuss des rekombinanten Proteins sowie den CDK-Inhibitoren DRB (10 µM) oder Flavopiridol (100 nM) versetzt (Totalvolumen 30 µl) und für 60 min. bei 30°C inkubiert. Für die in (**B**) gezeigten Versuche wurden die eingesetzten Eluate der MPCs empirisch auf ihren Gehalt an CDK9 normalisiert. Als Kontrollen dienten umgepufferte Eluate von Affinitätsreinigungen aus nicht transfizierten Zellen sowie ein rekombinantes 6xHis-GST Protein. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 2xLäemmlipuffer versetzt, über eine 15% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern für CDK9, Acetyl-Lysin, den AF4 N-Terminus und Phospho-Serin 2/5 des [YSPTSPS]-Peptids der RNAP II CTD.

5.5.2. HIV-1/TAR-Luciferase Reporter-genversuche

Hierfür wurden im Quadruplikat je 100 ng des HIV-1/TAR-Luciferase Reporterplasmids⁷⁵⁵, 10 ng des pSV40-Renilla Luciferase Kontrollvektors sowie 170 ng der pTARGET-AF4 oder pTARGET-AF4-MLL Expressionsplasmide oder eines Kontrollvektors (pTARGET) transient in 2×10^5 293T Zellen in 24-Kavitäten Zellkulturschalen transfiziert. Es wurde weder eine Co-Expression des HIV-1 Tat noch eine Behandlung mit TPA durchgeführt, um spezifisch die AF4- und AF4-MLL-vermittelten Effekte zu bestimmen. 24 Stunden nach dem Medienwechsel wurde die Biolumineszenz eines Triplikates unter Verwendung des *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim) gemäß Herstelleranleitung vermessen. Aus der vierten transfizierten Kavität wurden Gesamtzelllysate hergestellt und durch SDS-PAGE und Western-Blot auf die Anwesenheit von AF4 und AF4-MLL analysiert. Die Signale des Western-Blots wurden mittels des *Odyssey Imaging Systems* (LI-COR, USA) nach Herstellerangaben quantifiziert und die x-fache Induktion auf Basis der gemessenen Luciferaseaktivität in Korrelation mit der Menge detektierten Proteins kalkuliert. Dabei wurde der Messwert AF4 ohne MG132 arbiträr als 1 definiert.

5.5.3. ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent Assay*)

Zur Bestimmung der Menge an AF4 Protein in Gesamtzelllysaten aus HeLa und AF4kd V100 Zellen wurde ein kommerzielles Sandwich-ELISA System gemäß den Herstellerangaben eingesetzt (*ELISA Kit for AF4/FMR2 Family, Member 1 (AFF1)* der Firma USCN Life Science Inc., Houston, USA). Das Testprinzip soll kurz erläutert werden. Eine Mikrotiterplatte wird mit einem monoklonalen Antikörper für AF4 beschichtet. Die einzusetzenden Gesamtzelllysate werden mit einem distinkten, Biotin-konjugierten, polyklonalen Antikörper gegen AF4 inkubiert und anschließend in die Mikrotiterplatte gegeben und gewaschen. Anschließend wird ein Avidin-HRP Konjugat zugegeben, welches an den Biotin-konjugierten Antikörper bindet. Nach einer Inkubationsphase wird ein TMB Substrat (Tetramethylbenzidin) zugegeben. Nur Kavitäten der Platte mit AF4 und den entsprechenden Konjugaten können die HRP-vermittelte Farbreaktion ausführen. Nach dem Abstoppen der Reaktion wird die A450 gemessen und die Konzentration an AF4 Protein in der Probe durch lineare Regression an einer AF4 Standardkurve ermittelt. Alle Messungen der vergleichenden Standardreihe besaßen ein Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$.

5.5.4. (Co-)Immunpräzipitationen (IP)

Zur Immunpräzipitation wurden die eingesetzten Zelllysate/Kernfraktionen auf ihre Gesamtproteinkonzentration normiert und entsprechend aliquotiert. Ein unbehandeltes Aliquot wurde für die Einsatzprobe (*input*) aufgehoben. Die Proben wurden durch Zugabe

von 1 µg eines unspezifischen IgG-Antikörper sowie 20 µl Protein-G-Agarose (50%ig) und 30-minütiger Inkubation bei 4°C unter Rotation vorgeklärt um unspezifische Bindungen vollständig zu entfernen. Die Spezies des unspezifischen IgG-Antikörpers wurde gemäß dem folgenden, spezifischen Antikörper gewählt, bei multiplen Antikörpern wurde eine IgG-Antikörper aus der Ziege gewählt, da dieser die stärksten unspezifischen Interaktionen aufwies. Die Lysate wurden 5 min. bei 4°C, 2500 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig vollständig abgenommen und bei Bedarf aliquotiert. Anschließend wurde 1 µg des spezifischen Antikörpers zugegeben und für 1 Stunde bei 4°C unter Rotation inkubiert (Bindung des Epitops). Darauf wurden 25 µl Protein-G-Agarose (50%ig) zugegeben und weitere 2 Stunden bei gleichen Parametern inkubiert (Bindung des Antikörper-Epitop Komplex). Die Proben wurden erneut für 5 min. bei 4°C, 2500 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Agarose-Matrix wurde dreimal durch Zugabe von 500 µl (20-faches Matrixvolumen) des entsprechenden Lysispuffers (sehr stringent) oder 1xPBS (wenig stringent) und erneute Zentrifugation gewaschen und anschließend durch Zugabe von 30-60 µl 2xLäemmlipuffer und 5-minütigen Erhitzen bei 95°C eluiert. Die Eluate wurden anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot mit den jeweils angegebenen Antikörpern analysiert.

5.5.5. Strep-Tactin-Affinitätsaufreinigung von MPCs

Hierzu wurde das *One-STrEP-Tag*® System der Firma IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) mit *Strep-Tactin*® *Superflow*® Säulen (Bettvolumen 0,2 ml) gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Zur Affinitätsaufreinigung von Strep-markiertem AF4 und AF4N Proteinen und derer assoziierter Komplexe wurden die entsprechenden Expressionsplasmide (pITR-EZP-AF4ST, pITR-EZP-AF4NST) transient in 293T Zellen transfiziert (10 µg/2x10⁶ Zellen) und 48 Stunden nach Transfektion geerntet und Ganzzelllysate hergestellt. Alternativ wurden 1x10⁷ Zellen der stabilen, induzierbaren TCZP-AF4ST Zelllinie mit 1 µg/ml Doxycyclin im Kulturmedium induziert und 48 Stunden nach Induktion der Expression die Zellen geerntet und ebenfalls Ganzzelllysate hergestellt.

Zur Vermeidung unspezifischer Interaktionen und der irreversiblen Interaktion biotinylierter Proteine an das Strep-Tactin-Material wurden die Ganzzelllysate durch Zugabe von 10 µg Avidin und 30-minütiger Inkubation bei 4°C unter Rotation vorgeklärt. Parallel wurde der Aufbewahrungspuffer aus den Strep-Tactin-Säulen entfernt und die Säulen mit 5 ml Lysispuffer äquilibriert. Die Lysate wurden anschließend für 15 min. bei 4°C, 14.000 rpm zentrifugiert, wonach der Überstand auf die Strep-Tactin-Säule gegeben wurde und zweimal gravitationsgetrieben vollständig die Säule passieren musste. Der Durchfluss wurde danach verworfen. Die Säulen wurden fünfmal mit je 200 µl des Waschpuffers gewaschen und danach sechsmal mit je 100 µl Elutionspuffer eluiert. Aliquots der Eluat-Fractionen wurden

mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf die Anwesenheit des AF4 bzw. AF4N Proteins und ggf. anderer Proteine geprüft und die entsprechenden Eluat-Fraktionen vereinigt (i.d.R. Fraktion 2 bis 5) sowie abschließend die Gesamtproteinkonzentration photometrisch bestimmt. Es erfolgte keine Regeneration der Säulen.

5.5.6. P-TEFb-Speicherkomplex Dissoziationsversuche (*P-TEFb Release Assay*)

Hierzu wurden je 1×10^7 293T Zellen ausgesät und transient mit 40 µg der Expressionsvektoren pDF-CDK9, pDF-CDK9T186A oder pDF-CDK9K48A/K49A transfiziert. Nach 48 Stunden wurde je ~1 ml normiertes Gesamtzelllysat aus den Zellen hergestellt und mit je 20 µl nach Herstellerangaben äquilibrierter FLAG-spezifischer, magnetischer Matrix (*Anti-FLAG® M2 Magentic Beads*, Sigma) in Anwesenheit von 40 U/ml RNasin versetzt. Die Proben wurden zur Bindung an die Speicherkomplexe für 2 Stunden bei RT rotiert und anschließend zügig dreimal in 400 µl 1xTBST ohne RNasin gewaschen. Im letzten Waschschrift wurden die Proben in drei gleichwertige Aliquots aufgeteilt und nach Abtrennung in je 30 µl Release-Puffer ohne RNasin resuspendiert. Anschließend wurde je 1 µg RNase, GST-AF4N oder GST-HEXIM1 zugegeben und für 15 min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Matrix (P-TEFb) separiert und wie auch der Überstand (Speicherkomplexe) in 2xLäemmlipuffer für 5 min. bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung der angegebene Antikörper analysiert.

5.5.7. 7SK snRNA-Bindungsversuch

Für die Bindungsversuche wurden die aufgereinigten Proteine 6xHis-GST, 6xHis-GST-AF4N und 6xHis-GST-Tat an eine magnetische Glutathion-Matrix (*Pierce® Glutathione Magnetic Beads*, Thermo Scientific) gebunden. Dafür wurden 50 µg der rekombinanten Proteine (siehe Kapitel 5.3) mit 25 µl der reinen, in Waschpuffer äquilibrierten Matrix (entspricht 100 µl *Slurry*) in einem Gesamtvolumen von 500 µl für 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Matrix dreimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und danach mit 10 µg Gesamt-RNA aus 293T oder HeLa Zellen in einem Gesamtvolumen von 500 µl Waschpuffer für weitere 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Matrix erneut dreimal gewaschen und die Proteine anschließend in 50 µl Elutionspuffer von der Matrix eluiert. 10 µl der Eluate wurden in eine Reverse Transkriptase Reaktion eingesetzt um einen Teil der 7SK snRNA spezifisch umzuschreiben:

Eluatprobe	10 µl
7SK RT PCR fwd	0,5 µl (1 pmol)
7SK RT PCR rev	0,5 µl (1 pmol)

2,5 mM dNTP Mix 1 μ l

Die Reaktion würde für 5 min. bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden 4 μ l 5x *First Strand Buffer*, 2 μ l 0,1M DTT sowie 1 μ l RNasin zugegeben und weitere 2 min. bei 42°C inkubiert. Abschließend wurde 1 μ l der *SuperScript® II* Reversen Transkriptase (Invitrogen™) zugegeben und 50 min. bei 42°C sowie 15 min. bei 70°C inkubiert.

Nach der reversen Transkription erfolgte eine PCR zur Amplifikation und Kontrolle der 7SK cDNA. Dazu wurde 1 μ l aus der RT-PCR Reaktion eingesetzt und mit den analogen Oligonukleotiden über 40 Zyklen bei einer *Annealing* Temperatur von 55°C amplifiziert. Die Reaktion wurde anschließend auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Ein singuläres 133mer Amplifikat (7SK cDNA) wurde detektiert. Gleichzeitig wurden 2 μ l der Reaktion in einer qPCR eingesetzt, um die Amplifikation unter diesen Bedingungen zu prüfen. Auch hier wurde eine reproduzierbare Amplifikation festgestellt. Nach Bestätigung der korrekten reversen Transkription und Amplifikation wurden im Triplikate je 2 μ l der Reverse Transkriptase Reaktion in einer qPCR eingesetzt um mittels einer Standardreihe eine absolute Quantifizierung der 7SK cDNA aus den Eluaten durchzuführen. Dargestellt ist x-fache Bindung relativ zu rekombinanten 6xHis-GST Protein (+ S.E.M.).

Zur Erstellung der Standardreihe wurde die 7SK snRNA analog zu der oben beschriebenen Methode aus Gesamt-RNA spezifisch revers transkribiert und mittels PCR amplifiziert. Nach der Auftrennung auf dem Agarosegel wurde die cDNA aus dem Gel eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Ausgehend von einem Molekulargewicht von ~40500 g/mol (133mer einzelsträngige cDNA) wurde die theoretische Kopienzahl errechnet und durch qPCR eine Standardreihe der 7SK cDNA erzeugt (10^1 bis 10^8 Kopien). Die Bestimmung der Kopienzahl in den Proben erfolgte durch lineare Regression. Alle Standardreihen besaßen ein Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,90$ bzw. $> 0,99$ im Bereich von 10^4 bis 10^8 Kopien.

5.5.8. 7SK snRNA-Degradationsversuch

Dieser Versuch wurde durch Kombination von unbehandelten Gesamtzelllysaten aus 293T Zellen entweder mit rekombinanten Protein oder Gesamtzelllysaten mit überexprimiertem AF4ST. Für die Überexpression wurden 2×10^6 293T Zellen transient mit 10 μ g des Expressionsplasmids pTR-EZP-AF4ST transfiziert und nach 48 Stunden daraus 1 ml normiertes Gesamtzelllysat hergestellt. Je 100 μ l der Gesamtzelllysate (unbehandelt+AF4ST) wurden kombiniert, mit 50 μ l Lysispuffer aufgefüllt und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Im Falle des rekombinanten 6xHis-GST-AF4N wurden 200 μ l des

unbehandelten Lysats mit je 40 µg Protein inkubiert und mit Lysispuffer auf 250 µl aufgefüllt. Als Kontrollen wurden 250 µl des unbehandelten Lysats alleine (Negativkontrolle) oder mit 10 µg RNase (Positivkontrolle) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die RNA aus den Reaktionsansätzen gefällt und aufgereinigt. Analog zu Kapitel 5.5.7. wurde aus der RNA spezifisch die 7SK snRNA und β-Actin mRNA revers transkribiert, amplifiziert und mittels qPCR quantifiziert. Der β-Actinstandard war eine freundliche Gabe von Frau Thea Wöbke aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main.

5.5.9. Glycerolgradienten

Für die Herstellung des Glycerolgradienten wurden zehn Fraktionen zu je 1 ml hergestellt und in absteigender Viskosität vorsichtig in einen Ultrazentrifugenbecher gegeben. Die Fraktionen wurden mit 5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 35 und 40% (v/v) Glycerol in Glycerolgradienten-Puffer hergestellt. Der Gradient wurde mit Parafilm versiegelt und für 16 Stunden bei 4°C gelagert um eine vollständige Absetzung zu erzielen. Für die Proben wurden je 2×10^7 293T Zellen transient mit je 25 µg der Expressionsplasmide pITR-EZP-AF4ST, pITR-EZP-AF4NST oder pITR-EZP als Leervektorkontrolle transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion normierte Gesamtzelllysate zu je 1 ml hergestellt. Die Lysate wurden vollständig auf den Gradienten aufgetragen und für 21 Stunden bei 4°C, 38000 rpm ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Fraktionen vorsichtig getrennt und je ein Aliquot per SDS-PAGE und Western-Blot mit den beschriebenen Antikörpern analysiert.

5.5.10. ALOX5 Reporter-genversuche

Für die Reporter-genversuche wurden je 4×10^5 HeLa Zellen/Kavität in 24-Kavitäten Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die transiente Transfektion der Zellen im Triplikat mit je 225 ng Reporterplasmid (pN10 oder pGL3cdsInJM), 225 ng jedes Expressionsplasmids und 20 ng pSV40-Renilla Luciferase pro Kavität. Nach 48 Stunden wurde die jeweilige Biolumineszenz beider Luciferasen in den einzelnen Kavitäten durch das *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim) gemäß Herstellerangaben vermessen. Die Darstellung erfolgt in relativen Einheiten (RLU) als Quotient (*Firefly Luciferase Lumineszenz/Renilla Luciferase Lumineszenz*)*1000.

5.5.11. Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP)

Zur Herstellung des Chromatins wurden 5×10^6 293T Zellen transient mit je 15 µg der Expressionsplasmide pITR-EZP-AF4ST, pDTF-IE1 oder pDTF als Leervektorkontrolle transfiziert sowie die gleiche Anzahl Zellen unbehandelt belassen. Nach 48 Stunden wurden

die Zellen geerntet, gezählt und für 5 min. bei 4°C, 1200 rpm zentrifugiert sowie der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden einmal in 10 ml kaltem 1xPBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 ml 11% (v/v) Formaldehyd in ChIP-Puffer A für 30 min. bei RT quervernetzt. Danach wurden 1,1 ml 1,25 M Glycin zugegeben und für 5 min. bei RT rotiert. Die Proben wurden dann 7 min. bei 4°C, 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Es erfolgten zwei Waschschrte in 10 bzw. 15 ml kaltem 1xPBS und analoger Zentrifugation. Anschließend wurden die Proben in 25 ml kaltem ChIP-Puffer B resuspendiert und für 10 min. bei 4°C rotiert sowie 5 min. bei 4°C, 1600 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrte wurde analog mit 10 ml kaltem ChIP-Puffer C wiederholt. Die Pellets wurden anschließend in Inkubationspuffer für eine Konzentration von $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert. Die Proben wurden mittels eines *ChIP Bioruptor™ NextGen* (Diagenode) unter Kühlung sonifiziert (2x10 min. = 20 Zyklen zu je 30 sec. an/aus, *high power*). Zwischen den zwei Sonifikationen wurde die Temperatur der Probe geprüft. Abschließend wurden die Proben für 5 min. bei 4°C, 13000 rpm zentrifugiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Das Chromatin wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen, um einen ausreichenden Grad der Fragmentierung zu prüfen. Dazu wurden 40 µl des Chromatins mit 40 µl MQ verdünnt, auf 120 mM NaCl eingestellt, unter vortexen und 15 min. bei 99°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt und 10 µg RNase zugegeben sowie 10 min. bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die DNA Phenol/Chloroform-gereinigt und mit 250 µl 100% Ethanol für 30 min. bei -80°C gefällt und für 30 min. bei 4°C, 13000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschrte mit 150 µl 70% (v/v) Ethanol und Zentrifugation (1 min., 4°C, 13000 rpm) wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet getrocknet sowie in 30 µl MQ resuspendiert. Die Analyse des Chromatins erfolgte durch 1,5%-Agarosegelelektrophorese.

Zur Präzipitation wurden je Reaktion 25 µl einer magnetischen Protein-G-Agarose Matrix (*DiaMag Protein-G coated magnetic beads*, Diagenode) eingesetzt. Die Matrix wurde im Inkubationspuffer äquilibriert und in einer 250 µl Reaktion 120 µl des Chromatins zusammen mit der Matrix (25 µl), 1xPIC, 0,05% (w/v) BSA sowie 2 µg der Antikörper (Kaninchen-IgG, unspezifisch und Anti-acH3) in Inkubationspuffer bei 4°C für 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Matrix auf Eis zweimal in Waschpuffer 1, je einmal in Waschpuffer 2 und 3 sowie zweimal in Waschpuffer 4 gewaschen, d.h. in 400 µl des jeweiligen Puffers resuspendiert und für 1 Minute magnetisch separiert. Anschließend wurden 400 µl des Elutionspuffers zugegeben und für 20 min. bei RT rotiert sowie für eine Minute magnetisch separiert. Zur Abtrennung der Matrix von den Antikörpern wurden dem Überstand 16 µl 5 M NaCl zugeführt und für 5 Stunden bei 65°C unter Schütteln (1350 rpm) inkubiert. Die DNA wurde im Anschluss Phenol/Chloroform-gereinigt (je 400 µl) und 20 µg Glykogen zugegeben

und unter vortexen. Anschließend wurden zur Fällung 44 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8, zugeben sowie in 1 ml kalten 100% Ethanol für 16 Stunden bei -20°C inkubiert. Die Proben wurden dann für 20 min. bei 4°C, 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und in 500 µl kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min. und vollständiger Entfernung des Überstands wurden die Pellets für 5 min. bei 70°C getrocknet, mit 100 µl MQ versetzt, unter vortexen sowie 50 min. bei RT und weitere 10 min. bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden dann bei -20°C gelagert.

Die Analyse des CHIP erfolgte durch qPCR nach Standardprotokoll mit den Oligonukleotiden 5LOPromotor-FW/RV, 5LOIntron1-FW/RV und 5LOIntron13-FW/RV unter Einsatz der Proben Input 1-3, IgG 1-3 und acH3 1-3, wobei 1 den unbehandelten Zellen entspricht, 2 den AF4ST/pDTF-transfizierten Zellen und 3 den AF4ST/IE1-transfizierten Zellen. Die Bestimmung erfolgte jeweils im Triplikat. Die Amplifikate wurden durch 1,5%-Agarosegelelektrophorese geprüft. Die Auswertung erfolgte als relative Quantifizierung der Amplifikate gemäß $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode gegen die unbehandelten Zellen (definiert als 1) abzüglich den Signalen der IgG-Negativkontrolle normiert auf die Mengen in den Input-Proben.

5.5.12. Proteinfärbungen (Coomassie/Silberfärbung)

Für Coomassie-Färbungen von Proteinen wurden die Acrylamid-Gele nach der SDS-PAGE zur Entfernung des SDS mit vollentsalztem Wasser gewaschen und anschließend für 20 min. bei RT in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Gele erneut zweimal mit Wasser gewaschen und in Entfärbelösung bis zum gewünschten Färbegrad aufbewahrt und abfotografiert.

Für die Silberfärbung wurden die Gele analog gewaschen und für 30 min. bei RT in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 20 min. mit Wasser gewaschen, zur Reduktion der Hintergrundfärbung 2 min. in einer 0,02% (w/v) Natriumthiosulfatlösung inkubiert sowie weitere zweimal kurz in Wasser gewaschen. Danach wurden die Gele für 30 min. in Färbelösung inkubiert, erneut zweimal kurz gewaschen und bis zum gewünschten Färbegrad in Entwicklerlösung inkubiert (1-2 min.). Nach dessen Erreichen wurden die Gele in 1% (v/v) Essigsäure für 5 min. fixiert und abschließend abfotografiert.

5.6. Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte grundsätzlich manuell bzw. unter Zuhilfenahme gängiger mathematischer Funktionen der *Office Excel® 2007* Software von Microsoft® (Redmond, USA). Die Testung auf Signifikanz erfolgte durch einen Zweistichproben-t-Test, also zur statistischen Unterscheidung der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben gemäß der

Nullhypothese, dass beide Mittelwerte unterschiedlich voneinander sind. Die Signifikanz p folgendermaßen definiert wurde: n.s. (nicht signifikant) = $p > 0,05$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

6. Literaturverzeichnis

1. **Nurse PM**: Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Biosci Rep* 22: 487-99, 2002.
2. **Thomas MC and Chiang CM**: The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41: 105-78, 2006.
3. **Wilson CJ, Chao DM, Imbalzano AN, Schnitzler GR, Kingston RE and Young RA**: RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84: 235-44, 1996.
4. **Koh SS, Ansari AZ, Ptashne M and Young RA**: An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* 1: 895-904, 1998.
5. **Zawel L, Kumar KP and Reinberg D**: Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* 9: 1479-90, 1995.
6. **Yudkovsky N, Ranish JA and Hahn S**: A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408: 225-9, 2000.
7. **Li XY, Virbasius A, Zhu X and Green MR**: Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* 399: 605-9, 1999.
8. **Kuras L and Struhl K**: Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399: 609-13, 1999.
9. **Leuther KK, Bushnell DA and Kornberg RD**: Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* 85: 773-9, 1996.
10. **Cramer P, Bushnell DA and Kornberg RD**: Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292: 1863-76, 2001.
11. **Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T and Thanos D**: Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103: 667-78, 2000.
12. **Venters BJ, Wachi S, Mavrich TN, Andersen BE, Jena P, Sinnamon AJ, Jain P, Rolleri NS, Jiang C, Hemeryck-Walsh C and Pugh BF**: A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell* 41: 480-92, 2011.
13. **Ansari KI, Mishra BP and Mandal SS**: MLL histone methylases in gene expression, hormone signaling and cell cycle. *Front Biosci* 14: 3483-95, 2009.
14. **Lemon B and Tjian R**: Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14: 2551-69, 2000.
15. **Cosma MP, Tanaka T and Nasmyth K**: Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97: 299-311, 1999.
16. **Soutoglou E and Talianidis I**: Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295: 1901-4, 2002.
17. **Hatzis P and Talianidis I**: Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* 10: 1467-77, 2002.
18. **Liu X, Bushnell DA, Silva DA, Huang X and Kornberg RD**: Initiation complex structure and promoter proofreading. *Science* 333: 633-7, 2011.
19. **Komarnitsky P, Cho EJ and Buratowski S**: Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14: 2452-60, 2000.
20. **Dahmus ME**: Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 271: 19009-12, 1996.
21. **Buratowski S**: The CTD code. *Nat Struct Biol* 10: 679-80, 2003.
22. **Svejstrup JQ, Li Y, Fellows J, Gnat A, Bjorklund S and Kornberg RD**: Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6075-8, 1997.
23. **Usheva A, Maldonado E, Goldring A, Lu H, Houbavi C, Reinberg D and Aloni Y**: Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell* 69: 871-81, 1992.
24. **Proudfoot NJ, Furger A and Dye MJ**: Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108: 501-12, 2002.
25. **Hampsey M and Reinberg D**: Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113: 429-32, 2003.
26. **Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, Hasegawa J and Handa H**: NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97: 41-51, 1999.

27. **Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Ferdous A, Imai T, Hirose S, Sugimoto S, Yano K, Hartzog GA, Winston F, Buratowski S and Handa H:** DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12: 343-56, 1998.
28. **Wen Y and Shatkin AJ:** Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev* 13: 1774-9, 1999.
29. **Chiba K, Yamamoto J, Yamaguchi Y and Handa H:** Promoter-proximal pausing and its release: molecular mechanisms and physiological functions. *Exp Cell Res* 316: 2723-30, 2010.
30. **Peterlin BM and Price DH:** Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23: 297-305, 2006.
31. **Li B, Carey M and Workman JL:** The role of chromatin during transcription. *Cell* 128: 707-19, 2007.
32. **Fuda NJ, Ardehali MB and Lis JT:** Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* 461: 186-92, 2009.
33. **Kaplan CD, Laprade L and Winston F:** Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* 301: 1096-9, 2003.
34. **Schwabish MA and Struhl K:** Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 24: 10111-7, 2004.
35. **Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP and Workman JL:** Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123: 581-92, 2005.
36. **Ardehali MB and Lis JT:** Tracking rates of transcription and splicing in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1123-4, 2009.
37. **Bentley D:** The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr Opin Cell Biol* 14: 336-42, 2002.
38. **Kuehner JN, Pearson EL and Moore C:** Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 283-94, 2011.
39. **Ahn SH, Kim M and Buratowski S:** Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* 13: 67-76, 2004.
40. **Nag A, Narsinh K and Martinson HG:** The poly(A)-dependent transcriptional pause is mediated by CPSF acting on the body of the polymerase. *Nat Struct Mol Biol* 14: 662-9, 2007.
41. **Eggermont J and Proudfoot NJ:** Poly(A) signals and transcriptional pause sites combine to prevent interference between RNA polymerase II promoters. *EMBO J* 12: 2539-48, 1993.
42. **Archambault J, Pan G, Dahmus GK, Cartier M, Marshall N, Zhang S, Dahmus ME and Greenblatt J:** FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 273: 27593-601, 1998.
43. **Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S and Cramer P:** A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19: 1401-15, 2005.
44. **El Kaderi B, Medler S, Raghunayakula S and Ansari A:** Gene looping is conferred by activator-dependent interaction of transcription initiation and termination machineries. *J Biol Chem* 284: 25015-25, 2009.
45. **Calvo O and Manley JL:** Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Dev* 17: 1321-7, 2003.
46. **Singh BN and Hampsey M:** A transcription-independent role for TFIIB in gene looping. *Mol Cell* 27: 806-16, 2007.
47. **Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W and Fraser P:** Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* 36: 1065-71, 2004.
48. **Xu M and Cook PR:** Similar active genes cluster in specialized transcription factories. *J Cell Biol* 181: 615-23, 2008.
49. **Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW and Hogness DS:** The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 Pt 2: 1047-51, 1978.
50. **Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD and Ren B:** A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436: 876-80, 2005.
51. **Gershenson NI and Ioshikhes IP:** Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics* 21: 1295-300, 2005.
52. **Li XY, Bhaumik SR, Zhu X, Li L, Shen WC, Dixit BL and Green MR:** Selective recruitment of TAFs by yeast upstream activating sequences. Implications for eukaryotic promoter structure. *Curr Biol* 12: 1240-4, 2002.

53. **Amir-Zilberstein L, Ainbinder E, Toubé L, Yamaguchi Y, Handa H and Dikstein R:** Differential regulation of NF-kappaB by elongation factors is determined by core promoter type. *Mol Cell Biol* 27: 5246-59, 2007.
54. **Timmers HT, Meyers RE and Sharp PA:** Composition of transcription factor B-TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8140-4, 1992.
55. **Lee DH, Gershenzon N, Gupta M, Ioshikhes IP, Reinberg D and Lewis BA:** Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1. *Mol Cell Biol* 25: 9674-86, 2005.
56. **Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D and Ebricht RH:** New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12: 34-44, 1998.
57. **Carcamo J, Maldonado E, Cortes P, Ahn MH, Ha I, Kasai Y, Flint J and Reinberg D:** A TATA-like sequence located downstream of the transcription initiation site is required for expression of an RNA polymerase II transcribed gene. *Genes Dev* 4: 1611-22, 1990.
58. **Smale ST and Baltimore D:** The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103-13, 1989.
59. **Yarden G, Elfakess R, Gazit K and Dikstein R:** Characterization of sINR, a strict version of the Initiator core promoter element. *Nucleic Acids Res* 37: 4234-46, 2009.
60. **Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y and Hume DA:** Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8: 424-36, 2007.
61. **FitzGerald PC, Shlyakhtenko A, Mir AA and Vinson C:** Clustering of DNA sequences in human promoters. *Genome Res* 14: 1562-74, 2004.
62. **Frith MC, Valen E, Krogh A, Hayashizaki Y, Carninci P and Sandelin A:** A code for transcription initiation in mammalian genomes. *Genome Res* 18: 1-12, 2008.
63. **Moshonov S, Elfakess R, Golan-Mashiach M, Sinvani H and Dikstein R:** Links between core promoter and basic gene features influence gene expression. *BMC Genomics* 9: 92, 2008.
64. **Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM and Martinez E:** Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* 389: 52-65, 2007.
65. **Montanuy I, Torremocha R, Hernandez-Munain C and Sune C:** Promoter influences transcription elongation: TATA-box element mediates the assembly of processive transcription complexes responsive to cyclin-dependent kinase 9. *J Biol Chem* 283: 7368-78, 2008.
66. **Yean D and Gralla J:** Transcription reinitiation rate: a special role for the TATA box. *Mol Cell Biol* 17: 3809-16, 1997.
67. **Dobrzynski M and Bruggeman FJ:** Elongation dynamics shape bursty transcription and translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2583-8, 2009.
68. **Banerji J, Rusconi S and Schaffner W:** Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27: 299-308, 1981.
69. **Gillies SD, Morrison SL, Oi VT and Tonegawa S:** A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33: 717-28, 1983.
70. **Muller HP and Schaffner W:** Transcriptional enhancers can act in trans. *Trends Genet* 6: 300-4, 1990.
71. **Levine M and Tjian R:** Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424: 147-51, 2003.
72. **Barolo S and Posakony JW:** Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes Dev* 16: 1167-81, 2002.
73. **Mellerick DM and Nirenberg M:** Dorsal-ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system of *Drosophila* embryos. *Dev Biol* 171: 306-16, 1995.
74. **Istrail S and Davidson EH:** Logic functions of the genomic cis-regulatory code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4954-9, 2005.
75. **Berg OG and von Hippel PH:** Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 13: 207-11, 1988.
76. **Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB and et al.:** Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58: 537-44, 1989.
77. **Malik S and Roeder RG:** Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30: 256-63, 2005.

78. **Droge P and Muller-Hill B:** High local protein concentrations at promoters: strategies in prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays* 23: 179-83, 2001.
79. **Veitia RA:** One thousand and one ways of making functionally similar transcriptional enhancers. *Bioessays* 30: 1052-7, 2008.
80. **Arnosti DN and Kulkarni MM:** Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J Cell Biochem* 94: 890-8, 2005.
81. **McLean CY, Reno PL, Pollen AA, Bassan AI, Capellini TD, Guenther C, Indjeian VB, Lim X, Menke DB, Schaar BT, Wenger AM, Bejerano G and Kingsley DM:** Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits. *Nature* 471: 216-9, 2011.
82. **Bulger M and Groudine M:** Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13: 2465-77, 1999.
83. **Dorsett D:** Cohesin: genomic insights into controlling gene transcription and development. *Curr Opin Genet Dev* 21: 199-206, 2011.
84. **Mishiro T, Ishihara K, Hino S, Tsutsumi S, Aburatani H, Shirahige K, Kinoshita Y and Nakao M:** Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster. *EMBO J* 28: 1234-45, 2009.
85. **Panne D, Maniatis T and Harrison SC:** An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* 129: 1111-23, 2007.
86. **Merika M and Thanos D:** Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11: 205-8, 2001.
87. **Bushey AM, Dorman ER and Corces VG:** Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell* 32: 1-9, 2008.
88. **Gaszner M and Felsenfeld G:** Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7: 703-13, 2006.
89. **Phillips JE and Corces VG:** CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137: 1194-211, 2009.
90. **Ohlsson R, Renkawitz R and Lobanekov V:** CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* 17: 520-7, 2001.
91. **Splinter E, Heath H, Kooren J, Palstra RJ, Klous P, Grosveld F, Galjart N and de Laat W:** CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev* 20: 2349-54, 2006.
92. **Heath H, Ribeiro de Almeida C, Sleutels F, Dingjan G, van de Nobelen S, Jonkers I, Ling KW, Gribnau J, Renkawitz R, Grosveld F, Hendriks RW and Galjart N:** CTCF regulates cell cycle progression of alphabeta T cells in the thymus. *EMBO J* 27: 2839-50, 2008.
93. **Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG and Merkenschlager M:** Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132: 422-33, 2008.
94. **Rubio ED, Reiss DJ, Welcsh PL, Disteché CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA and Krumm A:** CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8309-14, 2008.
95. **Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K and Peters JM:** Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451: 796-801, 2008.
96. **Ishihara K, Oshimura M and Nakao M:** CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell* 23: 733-42, 2006.
97. **Chernukhin I, Shamsuddin S, Kang SY, Bergstrom R, Kwon YW, Yu W, Whitehead J, Mukhopadhyay R, Docquier F, Farrar D, Morrison I, Vigneron M, Wu SY, Chiang CM, Loukinov D, Lobanekov V, Ohlsson R and Klenova E:** CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Mol Cell Biol* 27: 1631-48, 2007.
98. **Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL and Ng HH:** Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133: 1106-17, 2008.
99. **Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, Zhang MQ, Lobanekov VV and Ren B:** Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128: 1231-45, 2007.
100. **Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui K and Zhao K:** Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res* 19: 24-32, 2009.
101. **Bell AC and Felsenfeld G:** Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405: 482-5, 2000.

102. **Hikichi T, Kohda T, Kaneko-Ishino T and Ishino F:** Imprinting regulation of the murine *Meg1/Grb10* and human *GRB10* genes; roles of brain-specific promoters and mouse-specific CTCF-binding sites. *Nucleic Acids Res* 31: 1398-406, 2003.
103. **Yoon B, Herman H, Hu B, Park YJ, Lindroth A, Bell A, West AG, Chang Y, Stablewski A, Piel JC, Loukinov DI, Lobanekov VV and Soloway PD:** *Rasgrf1* imprinting is regulated by a CTCF-dependent methylation-sensitive enhancer blocker. *Mol Cell Biol* 25: 11184-90, 2005.
104. **Rodriguez C, Borgel J, Court F, Cathala G, Forne T and Piette J:** CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the *INK/ARF* locus. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 129-34, 2010.
105. **Klenova EM, Chernukhin IV, El-Kady A, Lee RE, Pugacheva EM, Loukinov DI, Goodwin GH, Delgado D, Filippova GN, Leon J, Morse HC, 3rd, Neiman PE and Lobanekov VV:** Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol* 21: 2221-34, 2001.
106. **Guastafierro T, Cecchinelli B, Zampieri M, Reale A, Riggio G, Sthandier O, Zupi G, Calabrese L and Caiafa P:** CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J Biol Chem* 283: 21873-80, 2008.
107. **Jelinic P, Stehle JC and Shaw P:** The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol* 4: e355, 2006.
108. **Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR, Adnani MT, Loukinov DI, Vatolin S, Risinger JI, Custer M, Chen GA, Zhao M, Nguyen DM, Barrett JC, Lobanekov VV and Schrupp DS:** Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the *NY-ESO-1* promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res* 65: 7763-74, 2005.
109. **Hurwitz J:** The discovery of RNA polymerase. *J Biol Chem* 280: 42477-85, 2005.
110. **Haag JR and Pikaard CS:** Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 483-92, 2011.
111. **Vaughn MW and Martienssen RA:** Finding the right template: RNA Pol IV, a plant-specific RNA polymerase. *Mol Cell* 17: 754-6, 2005.
112. **Ebright RH:** RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* 304: 687-98, 2000.
113. **Wild T and Cramer P:** Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem Sci* 37: 99-105, 2012.
114. **Roeder RG and Rutter WJ:** Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65: 675-82, 1970.
115. **Weinmann R, Raskas HJ and Roeder RG:** Role of DNA-dependent RNA polymerases II and III in transcription of the adenovirus genome late in productive infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 3426-39, 1974.
116. **Russell J and Zomerdijk JC:** The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem Soc Symp*: 203-16, 2006.
117. **Geiduschek EP and Kassavetis GA:** The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol* 310: 1-26, 2001.
118. **Geiduschek EP and Tocchini-Valentini GP:** Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem* 57: 873-914, 1988.
119. **Willis IM:** RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur J Biochem* 212: 1-11, 1993.
120. **Sims RJ, 3rd, Mandal SS and Reinberg D:** Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16: 263-71, 2004.
121. **Cramer P, Armache KJ, Baumli S, Benkert S, Brueckner F, Buchen C, Damsma GE, Dengl S, Geiger SR, Jasiak AJ, Jawhari A, Jennebach S, Kamenski T, Kettenberger H, Kuhn CD, Lehmann E, Leike K, Sydow JF and Vannini A:** Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys* 37: 337-52, 2008.
122. **Chen ZA, Jawhari A, Fischer L, Buchen C, Tahir S, Kamenski T, Rasmussen M, Lariviere L, Bukowski-Wills JC, Nilges M, Cramer P and Rappsilber J:** Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *EMBO J* 29: 717-26, 2010.
123. **Armache KJ, Mitterweger S, Meinhart A and Cramer P:** Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem* 280: 7131-4, 2005.
124. **Ishihama A:** Subunit of assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Adv Biophys* 14: 1-35, 1981.

125. **Vassilyev DG, Sekine S, Laptenko O, Lee J, Vassilyeva MN, Borukhov S and Yokoyama S:** Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417: 712-9, 2002.
126. **Kimura M, Ishiguro A and Ishihama A:** RNA polymerase II subunits 2, 3, and 11 form a core subassembly with DNA binding activity. *J Biol Chem* 272: 25851-5, 1997.
127. **Kolodziej PA and Young RA:** Mutations in the three largest subunits of yeast RNA polymerase II that affect enzyme assembly. *Mol Cell Biol* 11: 4669-78, 1991.
128. **Forget D, Lacombe AA, Cloutier P, Al-Khoury R, Bouchard A, Lavallee-Adam M, Faubert D, Jeronimo C, Blanchette M and Coulombe B:** The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Mol Cell Proteomics* 9: 2827-39, 2010.
129. **Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, Poitras C, Therien C, Bergeron D, Bourassa S, Greenblatt J, Chabot B, Poirier GG, Hughes TR, Blanchette M, Price DH and Coulombe B:** Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* 27: 262-74, 2007.
130. **Boulon S, Pradet-Balade B, Verheggen C, Molle D, Boireau S, Georgieva M, Azzag K, Robert MC, Ahmad Y, Neel H, Lamond AI and Bertrand E:** HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell* 39: 912-24, 2010.
131. **Carre C and Shiekhatar R:** Human GTPases associate with RNA polymerase II to mediate its nuclear import. *Mol Cell Biol* 31: 3953-62, 2011.
132. **Czeko E, Seizl M, Augsberger C, Mielke T and Cramer P:** Iwr1 directs RNA polymerase II nuclear import. *Mol Cell* 42: 261-6, 2011.
133. **Peiro-Chova L and Estruch F:** The yeast RNA polymerase II-associated factor Iwr1p is involved in the basal and regulated transcription of specific genes. *J Biol Chem* 284: 28958-67, 2009.
134. **Orphanides G, Lagrange T and Reinberg D:** The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10: 2657-83, 1996.
135. **Sikorski TW and Buratowski S:** The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 21: 344-51, 2009.
136. **Liu P, Kenney JM, Stiller JW and Greenleaf AL:** Genetic organization, length conservation, and evolution of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Mol Biol Evol* 27: 2628-41, 2010.
137. **Kelly WG, Dahmus ME and Hart GW:** RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268: 10416-24, 1993.
138. **Sims RJ, 3rd, Rojas LA, Beck D, Bonasio R, Schuller R, Drury WJ, 3rd, Eick D and Reinberg D:** The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* 332: 99-103, 2011.
139. **Hsin JP, Sheth A and Manley JL:** RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* 334: 683-6, 2011.
140. **Hintermair C, Heidemann M, Koch F, Descostes N, Gut M, Gut I, Fenouil R, Ferrier P, Flatley A, Kremmer E, Chapman RD, Andrau JC and Eick D:** Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *EMBO J* 31: 2784-97, 2012.
141. **Corden JL and Patturajan M:** A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem Sci* 22: 413-6, 1997.
142. **Egloff S and Murphy S:** Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24: 280-8, 2008.
143. **Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, Wilson CJ, Koh SS and Young RA:** Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2: 43-53, 1998.
144. **Akhtar MS, Heidemann M, Tietjen JR, Zhang DW, Chapman RD, Eick D and Ansari AZ:** TFIIF kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 34: 387-93, 2009.
145. **Marshall NF, Peng J, Xie Z and Price DH:** Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* 271: 27176-83, 1996.
146. **Cheng B and Price DH:** Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *J Biol Chem* 282: 21901-12, 2007.
147. **Renner DB, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H and Price DH:** A highly purified RNA polymerase II elongation control system. *J Biol Chem* 276: 42601-9, 2001.

148. **Blazek D, Kohoutek J, Bartholomeeussen K, Johansen E, Hulinkova P, Luo Z, Cimermancic P, Ule J and Peterlin BM:** The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev* 25: 2158-72, 2011.
149. **Galbraith MD, Donner AJ and Espinosa JM:** CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription* 1: 4-12, 2010.
150. **Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sanso M, Zhang C, Allen JJ, Shokat KM, Bentley DL and Fisher RP:** Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 19: 1108-15, 2012.
151. **Devaiah BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG, Ozato K, Sims RJ, 3rd and Singer DS:** BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6927-32, 2012.
152. **Devaiah BN and Singer DS:** Cross-talk among RNA polymerase II kinases modulates C-terminal domain phosphorylation. *J Biol Chem* 287: 38755-66, 2012.
153. **Xu YX, Hirose Y, Zhou XZ, Lu KP and Manley JL:** Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II. *Genes Dev* 17: 2765-76, 2003.
154. **Chesnut JD, Stephens JH and Dahmus ME:** The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit Ila. *J Biol Chem* 267: 10500-6, 1992.
155. **Cho H, Kim TK, Mancebo H, Lane WS, Flores O and Reinberg D:** A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* 13: 1540-52, 1999.
156. **Hausmann S and Shuman S:** Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. *J Biol Chem* 277: 21213-20, 2002.
157. **Krishnamurthy S, He X, Reyes-Reyes M, Moore C and Hampsey M:** Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* 14: 387-94, 2004.
158. **Zhang DW, Mosley AL, Ramisetty SR, Rodriguez-Molina JB, Washburn MP and Ansari AZ:** Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *J Biol Chem* 287: 8541-51, 2012.
159. **Xiang K, Nagaike T, Xiang S, Kilic T, Beh MM, Manley JL and Tong L:** Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature* 467: 729-33, 2010.
160. **Bataille AR, Jeronimo C, Jacques PE, Laramée L, Fortin ME, Forest A, Bergeron M, Hanes SD and Robert F:** A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Mol Cell* 45: 158-70, 2012.
161. **Tietjen JR, Zhang DW, Rodriguez-Molina JB, White BE, Akhtar MS, Heidemann M, Li X, Chapman RD, Shokat K, Keles S, Eick D and Ansari AZ:** Chemical-genomic dissection of the CTD code. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1154-61, 2010.
162. **Mayer A, Lidschreiber M, Siebert M, Leike K, Soding J and Cramer P:** Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1272-8, 2010.
163. **Glover-Cutter K, Larochelle S, Erickson B, Zhang C, Shokat K, Fisher RP and Bentley DL:** TFIIH-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 29: 5455-64, 2009.
164. **Lee JH and Skalnik DG:** Wdr82 is a C-terminal domain-binding protein that recruits the Setd1A Histone H3-Lys4 methyltransferase complex to transcription start sites of transcribed human genes. *Mol Cell Biol* 28: 609-18, 2008.
165. **Milne TA, Dou Y, Martin ME, Brock HW, Roeder RG and Hess JL:** MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14765-70, 2005.
166. **Li M, Phatnani HP, Guan Z, Sage H, Greenleaf AL and Zhou P:** Solution structure of the Set2-Rpb1 interacting domain of human Set2 and its interaction with the hyperphosphorylated C-terminal domain of Rpb1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17636-41, 2005.
167. **Sun M, Lariviere L, Dengl S, Mayer A and Cramer P:** A tandem SH2 domain in transcription elongation factor Spt6 binds the phosphorylated RNA polymerase II C-terminal repeat domain (CTD). *J Biol Chem* 285: 41597-603, 2010.
168. **Yoh SM, Lucas JS and Jones KA:** The Iws1:Spt6:CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB/Setd2-mediated histone H3K36 methylation. *Genes Dev* 22: 3422-34, 2008.
169. **McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G, Greenblatt J, Patterson SD, Wickens M and Bentley DL:** The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385: 357-61, 1997.

170. **Fong N, Bird G, Vigneron M and Bentley DL:** A 10 residue motif at the C-terminus of the RNA pol II CTD is required for transcription, splicing and 3' end processing. *EMBO J* 22: 4274-82, 2003.
171. **Chapman RD, Palancade B, Lang A, Bensaude O and Eick D:** The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability. *Nucleic Acids Res* 32: 35-44, 2004.
172. **Coppola JA, Field AS and Luse DS:** Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1251-5, 1983.
173. **Ho CK and Shuman S:** Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Mol Cell* 3: 405-11, 1999.
174. **Misteli T and Spector DL:** RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* 3: 697-705, 1999.
175. **Morris DP and Greenleaf AL:** The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 275: 39935-43, 2000.
176. **David CJ, Boyne AR, Millhouse SR and Manley JL:** The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65-Prp19 complex. *Genes Dev* 25: 972-83, 2011.
177. **Eberle AB, Hesse V, Helbig R, Dantoft W, Gimber N and Visa N:** Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PLoS One* 5: e11540, 2010.
178. **Martins SB, Rino J, Carvalho T, Carvalho C, Yoshida M, Klose JM, de Almeida SF and Carmo-Fonseca M:** Spliceosome assembly is coupled to RNA polymerase II dynamics at the 3' end of human genes. *Nat Struct Mol Biol* 18: 1115-23, 2011.
179. **Bres V, Gomes N, Pickle L and Jones KA:** A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev* 19: 1211-26, 2005.
180. **Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S and Fu XD:** The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol* 15: 819-26, 2008.
181. **Hirose Y and Manley JL:** RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395: 93-6, 1998.
182. **Ni Z, Schwartz BE, Werner J, Suarez JR and Lis JT:** Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* 13: 55-65, 2004.
183. **Proudfoot NJ:** How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 14: 105-10, 1989.
184. **Connelly S and Manley JL:** A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev* 2: 440-52, 1988.
185. **West S, Gromak N and Proudfoot NJ:** Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* 432: 522-5, 2004.
186. **Kaneko S, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M and Manley JL:** The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev* 21: 1779-89, 2007.
187. **Rosonina E, Ip JY, Calarco JA, Bakowski MA, Emili A, McCracken S, Tucker P, Ingles CJ and Blencowe BJ:** Role for PSF in mediating transcriptional activator-dependent stimulation of pre-mRNA processing in vivo. *Mol Cell Biol* 25: 6734-46, 2005.
188. **Suraweera A, Lim Y, Woods R, Birrell GW, Nasim T, Becherel OJ and Lavin MF:** Functional role for senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, in transcriptional regulation. *Hum Mol Genet* 18: 3384-96, 2009.
189. **Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ and Gromak N:** Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Mol Cell* 42: 794-805, 2011.
190. **Bregman DB, Halaban R, van Gool AJ, Henning KA, Friedberg EC and Warren SL:** UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11586-90, 1996.
191. **Inukai N, Yamaguchi Y, Kuraoka I, Yamada T, Kamijo S, Kato J, Tanaka K and Handa H:** A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis. *J Biol Chem* 279: 8190-5, 2004.
192. **Beaudenon SL, Huacani MR, Wang G, McDonnell DP and Huibregtse JM:** Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 6972-9, 1999.
193. **Kuznetsova AV, Meller J, Schnell PO, Nash JA, Ignacak ML, Sanchez Y, Conaway JW, Conaway RC and Czyzyk-Krzeska MF:** von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large

- subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2706-11, 2003.
194. **Krum SA, Miranda GA, Lin C and Lane TF**: BRCA1 associates with processive RNA polymerase II. *J Biol Chem* 278: 52012-20, 2003.
195. **Mitsui A and Sharp PA**: Ubiquitination of RNA polymerase II large subunit signaled by phosphorylation of carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6054-9, 1999.
196. **Ge H, Martinez E, Chiang CM and Roeder RG**: Activator-dependent transcription by mammalian RNA polymerase II: in vitro reconstitution with general transcription factors and cofactors. *Methods Enzymol* 274: 57-71, 1996.
197. **Dynlacht BD, Hoey T and Tjian R**: Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66: 563-76, 1991.
198. **Tanese N, Pugh BF and Tjian R**: Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes Dev* 5: 2212-24, 1991.
199. **Basehoar AD, Zanton SJ and Pugh BF**: Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 116: 699-709, 2004.
200. **Nikolov DB, Chen H, Halay ED, Hoffman A, Roeder RG and Burley SK**: Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4862-7, 1996.
201. **Juo ZS, Chiu TK, Leiberman PM, Baikalov I, Berk AJ and Dickerson RE**: How proteins recognize the TATA box. *J Mol Biol* 261: 239-54, 1996.
202. **Taggart AK and Pugh BF**: Dimerization of TFIID when not bound to DNA. *Science* 272: 1331-3, 1996.
203. **Banik U, Beechem JM, Klebanow E, Schroeder S and Weil PA**: Fluorescence-based analyses of the effects of full-length recombinant TAF130p on the interaction of TATA box-binding protein with TATA box DNA. *J Biol Chem* 276: 49100-9, 2001.
204. **Kokubo T, Swanson MJ, Nishikawa JI, Hinnebusch AG and Nakatani Y**: The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 18: 1003-12, 1998.
205. **Klejman MP, Zhao X, van Schaik FM, Herr W and Timmers HT**: Mutational analysis of BTAF1-TBP interaction: BTAF1 can rescue DNA-binding defective TBP mutants. *Nucleic Acids Res* 33: 5426-36, 2005.
206. **Klejman MP, Pereira LA, van Zeeburg HJ, Gilfillan S, Meisterernst M and Timmers HT**: NC2alpha interacts with BTAF1 and stimulates its ATP-dependent association with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 24: 10072-82, 2004.
207. **Coleman RA, Taggart AK, Burma S, Chicca JJ, 2nd and Pugh BF**: TFIIA regulates TBP and TFIID dimers. *Mol Cell* 4: 451-7, 1999.
208. **Auble DT and Hahn S**: An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA. *Genes Dev* 7: 844-56, 1993.
209. **Imbalzano AN, Zaret KS and Kingston RE**: Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J Biol Chem* 269: 8280-6, 1994.
210. **Zhao X and Herr W**: A regulated two-step mechanism of TBP binding to DNA: a solvent-exposed surface of TBP inhibits TATA box recognition. *Cell* 108: 615-27, 2002.
211. **Imbalzano AN, Kwon H, Green MR and Kingston RE**: Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370: 481-5, 1994.
212. **Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y and Allis CD**: The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87: 1261-70, 1996.
213. **Wu SY, Thomas MC, Hou SY, Likhite V and Chiang CM**: Isolation of mouse TFIID and functional characterization of TBP and TFIID in mediating estrogen receptor and chromatin transcription. *J Biol Chem* 274: 23480-90, 1999.
214. **Jacobson RH, Ladurner AG, King DS and Tjian R**: Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288: 1422-5, 2000.
215. **Kanno T, Kanno Y, Siegel RM, Jang MK, Lenardo MJ and Ozato K**: Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell* 13: 33-43, 2004.
216. **Imhof A, Yang XJ, Ogrzyzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP and Ge H**: Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* 7: 689-92, 1997.
217. **Maile T, Kwoczynski S, Katzenberger RJ, Wassarman DA and Sauer F**: TAF1 activates transcription by phosphorylation of serine 33 in histone H2B. *Science* 304: 1010-4, 2004.
218. **Chiang CM and Roeder RG**: Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267: 531-6, 1995.

219. **Wu SY and Chiang CM:** TATA-binding protein-associated factors enhance the recruitment of RNA polymerase II by transcriptional activators. *J Biol Chem* 276: 34235-43, 2001.
220. **Yokomori K, Admon A, Goodrich JA, Chen JL and Tjian R:** Drosophila TFIIA-L is processed into two subunits that are associated with the TBP/TAF complex. *Genes Dev* 7: 2235-45, 1993.
221. **Goodrich JA, Hoey T, Thut CJ, Admon A and Tjian R:** Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIIB. *Cell* 75: 519-30, 1993.
222. **Hisatake K, Ohta T, Takada R, Guermah M, Horikoshi M, Nakatani Y and Roeder RG:** Evolutionary conservation of human TATA-binding-polypeptide-associated factors TAFII31 and TAFII80 and interactions of TAFII80 with other TAFs and with general transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8195-9, 1995.
223. **Ruppert S and Tjian R:** Human TAFII250 interacts with RAP74: implications for RNA polymerase II initiation. *Genes Dev* 9: 2747-55, 1995.
224. **DeJong J and Roeder RG:** A single cDNA, hTFIIA/alpha, encodes both the p35 and p19 subunits of human TFIIA. *Genes Dev* 7: 2220-34, 1993.
225. **Solow S, Salunek M, Ryan R and Lieberman PM:** Taf(II) 250 phosphorylates human transcription factor IIA on serine residues important for TBP binding and transcription activity. *J Biol Chem* 276: 15886-92, 2001.
226. **Mitsiou DJ and Stunnenberg HG:** p300 is involved in formation of the TBP-TFIIA-containing basal transcription complex, TAC. *EMBO J* 22: 4501-11, 2003.
227. **Ge H and Roeder RG:** Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell* 78: 513-23, 1994.
228. **Maldonado E, Ha I, Cortes P, Weis L and Reinberg D:** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell Biol* 10: 6335-47, 1990.
229. **Langelier MF, Forget D, Rojas A, Porlier Y, Burton ZF and Coulombe B:** Structural and functional interactions of transcription factor (TF) IIA with TFIIIE and TFIIIF in transcription initiation by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 276: 38652-7, 2001.
230. **Ozer J, Lezina LE, Ewing J, Audi S and Lieberman PM:** Association of transcription factor IIA with TATA binding protein is required for transcriptional activation of a subset of promoters and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18: 2559-70, 1998.
231. **Hampsey M:** Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 465-503, 1998.
232. **Hahn S:** Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11: 394-403, 2004.
233. **Tsai FT and Sigler PB:** Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J* 19: 25-36, 2000.
234. **Chen HT and Hahn S:** Binding of TFIIIB to RNA polymerase II: Mapping the binding site for the TFIIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex. *Mol Cell* 12: 437-47, 2003.
235. **Ha I, Roberts S, Maldonado E, Sun X, Kim LU, Green M and Reinberg D:** Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev* 7: 1021-32, 1993.
236. **Bushnell DA, Westover KD, Davis RE and Kornberg RD:** Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIIB cocrystal at 4.5 Angstroms. *Science* 303: 983-8, 2004.
237. **Elsby LM and Roberts SG:** The role of TFIIIB conformation in transcriptional regulation. *Biochem Soc Trans* 32: 1098-9, 2004.
238. **Wang Y, Fairley JA and Roberts SG:** Phosphorylation of TFIIIB links transcription initiation and termination. *Curr Biol* 20: 548-53, 2010.
239. **Flores O, Ha I and Reinberg D:** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Purification and subunit composition of transcription factor IIF. *J Biol Chem* 265: 5629-34, 1990.
240. **Fang SM and Burton ZF:** RNA polymerase II-associated protein (RAP) 74 binds transcription factor (TF) IIB and blocks TFIIIB-RAP30 binding. *J Biol Chem* 271: 11703-9, 1996.
241. **Sopta M, Burton ZF and Greenblatt J:** Structure and associated DNA-helicase activity of a general transcription initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Nature* 341: 410-4, 1989.
242. **Funk JD, Nedialkov YA, Xu D and Burton ZF:** A key role for the alpha 1 helix of human RAP74 in the initiation and elongation of RNA chains. *J Biol Chem* 277: 46998-7003, 2002.
243. **Forget D, Langelier MF, Therien C, Trinh V and Coulombe B:** Photo-cross-linking of a purified preinitiation complex reveals central roles for the RNA polymerase II mobile clamp and TFIIIE in initiation mechanisms. *Mol Cell Biol* 24: 1122-31, 2004.

244. **Robert F, Douziech M, Forget D, Egly JM, Greenblatt J, Burton ZF and Coulombe B:** Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIF. *Mol Cell* 2: 341-51, 1998.
245. **Lei L, Ren D, Finkelstein A and Burton ZF:** Functions of the N- and C-terminal domains of human RAP74 in transcriptional initiation, elongation, and recycling of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 18: 2130-42, 1998.
246. **Flores O, Lu H, Killeen M, Greenblatt J, Burton ZF and Reinberg D:** The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9999-10003, 1991.
247. **Wei W, Dorjsuren D, Lin Y, Qin W, Nomura T, Hayashi N and Murakami S:** Direct interaction between the subunit RAP30 of transcription factor IIF (TFIIF) and RNA polymerase subunit 5, which contributes to the association between TFIIF and RNA polymerase II. *J Biol Chem* 276: 12266-73, 2001.
248. **Hou SY, Wu SY, Zhou T, Thomas MC and Chiang CM:** Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol Cell Biol* 20: 113-25, 2000.
249. **Ohkuma Y, Sumimoto H, Hoffmann A, Shimasaki S, Horikoshi M and Roeder RG:** Structural motifs and potential sigma homologies in the large subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature* 354: 398-401, 1991.
250. **Sumimoto H, Ohkuma Y, Sinn E, Kato H, Shimasaki S, Horikoshi M and Roeder RG:** Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature* 354: 401-4, 1991.
251. **Ohkuma Y and Roeder RG:** Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* 368: 160-3, 1994.
252. **Kuldell NH and Buratowski S:** Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. *Mol Cell Biol* 17: 5288-98, 1997.
253. **Okamoto T, Yamamoto S, Watanabe Y, Ohta T, Hanaoka F, Roeder RG and Ohkuma Y:** Analysis of the role of TFIIE in transcriptional regulation through structure-function studies of the TFIIEbeta subunit. *J Biol Chem* 273: 19866-76, 1998.
254. **Okuda M, Watanabe Y, Okamura H, Hanaoka F, Ohkuma Y and Nishimura Y:** Structure of the central core domain of TFIIEbeta with a novel double-stranded DNA-binding surface. *EMBO J* 19: 1346-56, 2000.
255. **Watanabe T, Hayashi K, Tanaka A, Furumoto T, Hanaoka F and Ohkuma Y:** The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 23: 2914-26, 2003.
256. **Holstege FC, van der Vliet PC and Timmers HT:** Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J* 15: 1666-77, 1996.
257. **Pan G and Greenblatt J:** Initiation of transcription by RNA polymerase II is limited by melting of the promoter DNA in the region immediately upstream of the initiation site. *J Biol Chem* 269: 30101-4, 1994.
258. **Gerard M, Fischer L, Moncollin V, Chipoulet JM, Chambon P and Egly JM:** Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J Biol Chem* 266: 20940-5, 1991.
259. **Flores O, Lu H and Reinberg D:** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIH. *J Biol Chem* 267: 2786-93, 1992.
260. **Lu H, Zawel L, Fisher L, Egly JM and Reinberg D:** Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358: 641-5, 1992.
261. **Coin F, Bergmann E, Tremeau-Bravard A and Egly JM:** Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIF. *EMBO J* 18: 1357-66, 1999.
262. **Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, Jaspers NG, Raams A, Argentini M, van der Spek PJ, Botta E, Stefanini M, Egly JM, Aebersold R, Hoeijmakers JH and Vermeulen W:** A new, tenth subunit of TFIIF is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet* 36: 714-9, 2004.
263. **Coin F, Proietti De Santis L, Nardo T, Zlobinskaya O, Stefanini M and Egly JM:** p8/TTD-A as a repair-specific TFIIF subunit. *Mol Cell* 21: 215-26, 2006.
264. **Kumar KP, Akoulitchev S and Reinberg D:** Promoter-proximal stalling results from the inability to recruit transcription factor IIH to the transcription complex and is a regulated event. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9767-72, 1998.

265. **Holstege FC, Fiedler U and Timmers HT**: Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *EMBO J* 16: 7468-80, 1997.
266. **Goodrich JA and Tjian R**: Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* 77: 145-56, 1994.
267. **Zurita M and Merino C**: The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends Genet* 19: 578-84, 2003.
268. **Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, Egly JM, Chambon P and Rochette-Egly C**: TFIID interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* 275: 21896-904, 2000.
269. **Bjorklund S and Gustafsson CM**: The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem Sci* 30: 240-4, 2005.
270. **Kaiser K and Meisterernst M**: The human general co-factors. *Trends Biochem Sci* 21: 342-5, 1996.
271. **Bourbon HM, Aguilera A, Ansari AZ, Asturias FJ, Berk AJ, Bjorklund S, Blackwell TK, Borggreffe T, Carey M, Carlson M, Conaway JW, Conaway RC, Emmons SW, Fondell JD, Freedman LP, Fukasawa T, Gustafsson CM, Han M, He X, Herman PK, Hinnebusch AG, Holmberg S, Holstege FC, Jaehning JA, Kim YJ, Kuras L, Leutz A, Lis JT, Meisterernst M, Naar AM, Nasmyth K, Parvin JD, Ptashne M, Reinberg D, Ronne H, Sadowski I, Sakurai H, Sipiczki M, Sternberg PW, Stillman DJ, Strich R, Struhl K, Svejstrup JQ, Tuck S, Winston F, Roeder RG and Kornberg RD**: A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* 14: 553-7, 2004.
272. **Fondell JD, Ge H and Roeder RG**: Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8329-33, 1996.
273. **Ito M, Yuan CX, Malik S, Gu W, Fondell JD, Yamamura S, Fu ZY, Zhang X, Qin J and Roeder RG**: Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3: 361-70, 1999.
274. **Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CP, Burakov D, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Freedman LP**: A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev* 12: 1787-800, 1998.
275. **Sun X, Zhang Y, Cho H, Rickert P, Lees E, Lane W and Reinberg D**: NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol Cell* 2: 213-22, 1998.
276. **Taatjes DJ, Naar AM, Andel F, 3rd, Nogales E and Tjian R**: Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295: 1058-62, 2002.
277. **Dotson MR, Yuan CX, Roeder RG, Myers LC, Gustafsson CM, Jiang YW, Li Y, Kornberg RD and Asturias FJ**: Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14307-10, 2000.
278. **Asturias FJ, Jiang YW, Myers LC, Gustafsson CM and Kornberg RD**: Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* 283: 985-7, 1999.
279. **Blazek E, Mittler G and Meisterernst M**: The mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* 113: 399-408, 2005.
280. **Chadick JZ and Asturias FJ**: Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem Sci* 30: 264-71, 2005.
281. **Conaway RC, Sato S, Tomomori-Sato C, Yao T and Conaway JW**: The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 30: 250-5, 2005.
282. **Lee YC, Park JM, Min S, Han SJ and Kim YJ**: An activator binding module of yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* 19: 2967-76, 1999.
283. **Davis JA, Takagi Y, Kornberg RD and Asturias FA**: Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* 10: 409-15, 2002.
284. **Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY and Roeder RG**: The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7939-44, 1998.
285. **Borggreffe T, Davis R, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Kornberg RD**: A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem* 277: 44202-7, 2002.
286. **Kang JS, Kim SH, Hwang MS, Han SJ, Lee YC and Kim YJ**: The structural and functional organization of the yeast mediator complex. *J Biol Chem* 276: 42003-10, 2001.
287. **Guglielmi B, van Berkum NL, Klapholz B, Bijma T, Boube M, Boschiero C, Bourbon HM, Holstege FC and Werner M**: A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res* 32: 5379-91, 2004.

288. **Akoulitchev S, Chuikov S and Reinberg D:** TFIIF is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407: 102-6, 2000.
289. **Mittler G, Kremmer E, Timmers HT and Meisterernst M:** Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Rep* 2: 808-13, 2001.
290. **Wu SY, Zhou T and Chiang CM:** Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Mol Cell Biol* 23: 6229-42, 2003.
291. **Kim YJ, Bjorklund S, Li Y, Sayre MH and Kornberg RD:** A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77: 599-608, 1994.
292. **Meisterernst M, Stelzer G and Roeder RG:** Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2261-5, 1997.
293. **Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG and Klungland A:** Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 20: 405-11, 1995.
294. **D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I and Poirier GG:** Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 (Pt 2): 249-68, 1999.
295. **Rawling JM and Alvarez-Gonzalez R:** TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosyl)ation. *Biochem J* 324 (Pt 1): 249-53, 1997.
296. **Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M and Ziegler M:** Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosyl)ation of transcription factors. *J Biol Chem* 273: 31644-7, 1998.
297. **Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Samara R, Espinoza LA, Hassa PO, Hottiger MO and Smulson ME:** PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA binding and catalytic domains, and acts as a novel coactivator of E2F-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. *Oncogene* 22: 8460-71, 2003.
298. **Lee D, Kim JW, Kim K, Joe CO, Schreiber V, Menissier-De Murcia J and Choe J:** Functional interaction between human papillomavirus type 18 E2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Oncogene* 21: 5877-85, 2002.
299. **Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R and Hottiger MO:** Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* 278: 45145-53, 2003.
300. **Hassa PO, Haenni SS, Buerki C, Meier NI, Lane WS, Owen H, Gersbach M, Imhof R and Hottiger MO:** Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J Biol Chem* 280: 40450-64, 2005.
301. **Pavri R, Lewis B, Kim TK, Dilworth FJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, de Murcia G, Evans R, Chambon P and Reinberg D:** PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol Cell* 18: 83-96, 2005.
302. **Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, Glass CK and Rosenfeld MG:** Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119: 815-29, 2004.
303. **Kim MY, Mauro S, Gevry N, Lis JT and Kraus WL:** NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119: 803-14, 2004.
304. **Malanga M, Pleschke JM, Kleczkowska HE and Althaus FR:** Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J Biol Chem* 273: 11839-43, 1998.
305. **Mendoza-Alvarez H and Alvarez-Gonzalez R:** Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosyl)ation. *J Biol Chem* 276: 36425-30, 2001.
306. **Meisterernst M and Roeder RG:** Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell* 67: 557-67, 1991.
307. **Malik S, Gu W, Wu W, Qin J and Roeder RG:** The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol Cell* 5: 753-60, 2000.
308. **Guermah M, Malik S and Roeder RG:** Involvement of TFIID and USA components in transcriptional activation of the human immunodeficiency virus promoter by NF-kappaB and Sp1. *Mol Cell Biol* 18: 3234-44, 1998.
309. **Kretzschmar M, Meisterernst M and Roeder RG:** Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11508-12, 1993.
310. **Wang JC:** Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430-40, 2002.

311. **Gobert C, Skladanowski A and Larsen AK:** The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10355-60, 1999.
312. **Malanga M and Althaus FR:** Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. *J Biol Chem* 279: 5244-8, 2004.
313. **Merino A, Madden KR, Lane WS, Champoux JJ and Reinberg D:** DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* 365: 227-32, 1993.
314. **Shykind BM, Kim J, Stewart L, Champoux JJ and Sharp PA:** Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev* 11: 397-407, 1997.
315. **Kaiser K, Stelzer G and Meisterernst M:** The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation. *EMBO J* 14: 3520-7, 1995.
316. **Kretzschmar M, Kaiser K, Lottspeich F and Meisterernst M:** A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78: 525-34, 1994.
317. **Holloway AF, Occhiodoro F, Mittler G, Meisterernst M and Shannon MF:** Functional interaction between the HIV transactivator Tat and the transcriptional coactivator PC4 in T cells. *J Biol Chem* 275: 21668-77, 2000.
318. **Kumar BR, Swaminathan V, Banerjee S and Kundu TK:** p300-mediated acetylation of human transcriptional coactivator PC4 is inhibited by phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 16804-9, 2001.
319. **Wu SY and Chiang CM:** Properties of PC4 and an RNA polymerase II complex in directing activated and basal transcription in vitro. *J Biol Chem* 273: 12492-8, 1998.
320. **Werten S, Stelzer G, Goppelt A, Langen FM, Gros P, Timmers HT, Van der Vliet PC and Meisterernst M:** Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *EMBO J* 17: 5103-11, 1998.
321. **Haile DT and Parvin JD:** Activation of transcription in vitro by the BRCA1 carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 274: 2113-7, 1999.
322. **Banerjee S, Kumar BR and Kundu TK:** General transcriptional coactivator PC4 activates p53 function. *Mol Cell Biol* 24: 2052-62, 2004.
323. **Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M and Hisatake K:** Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Mol Cell Biol* 24: 6525-35, 2004.
324. **Malik S, Guermah M and Roeder RG:** A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2192-7, 1998.
325. **Calvo O and Manley JL:** The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription. *EMBO J* 24: 1009-20, 2005.
326. **Bustin M:** Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 152-3, 2001.
327. **Thomas JO:** HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 29: 395-401, 2001.
328. **Ge H and Roeder RG:** The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J Biol Chem* 269: 17136-40, 1994.
329. **Thomas JO and Travers AA:** HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 167-74, 2001.
330. **Agresti A and Bianchi ME:** HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 13: 170-8, 2003.
331. **Verrier CS, Roodi N, Yee CJ, Bailey LR, Jensen RA, Bustin M and Parl FF:** High-mobility group (HMG) protein HMG-1 and TATA-binding protein-associated factor TAF(II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 11: 1009-19, 1997.
332. **Price DH:** P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 20: 2629-34, 2000.
333. **Jang MK, Mochizuki K, Zhou M, Jeong HS, Brady JN and Ozato K:** The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 19: 523-34, 2005.
334. **Taube R, Lin X, Irwin D, Fujinaga K and Peterlin BM:** Interaction between P-TEFb and the C-terminal domain of RNA polymerase II activates transcriptional elongation from sites upstream or downstream of target genes. *Mol Cell Biol* 22: 321-31, 2002.
335. **Baumli S, Lolli G, Lowe ED, Troiani S, Rusconi L, Bullock AN, Debreczeni JE, Knapp S and Johnson LN:** The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO J* 27: 1907-18, 2008.

336. **Pavletich NP**: Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287: 821-8, 1999.
337. **Morgan DO**: Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-4, 1995.
338. **Li Q, Price JP, Byers SA, Cheng D, Peng J and Price DH**: Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *J Biol Chem* 280: 28819-26, 2005.
339. **Chen R, Yang Z and Zhou Q**: Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA. *J Biol Chem* 279: 4153-60, 2004.
340. **Ramakrishnan R and Rice AP**: Cdk9 T-loop phosphorylation is regulated by the calcium signaling pathway. *J Cell Physiol* 227: 609-17, 2012.
341. **Budhiraja S, Ramakrishnan R and Rice AP**: Phosphatase PPM1A negatively regulates P-TEFb function in resting CD4(+) T cells and inhibits HIV-1 gene expression. *Retrovirology* 9: 52, 2012.
342. **Chen R, Liu M, Li H, Xue Y, Ramey WN, He N, Ai N, Luo H, Zhu Y, Zhou N and Zhou Q**: PP2B and PP1alpha cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca²⁺ signaling. *Genes Dev* 22: 1356-68, 2008.
343. **Ammosova T, Yedavalli VR, Niu X, Jerebtsova M, Van Eynde A, Beullens M, Bollen M, Jeang KT and Nekhai S**: Expression of a protein phosphatase 1 inhibitor, cdNIPP1, increases CDK9 threonine 186 phosphorylation and inhibits HIV-1 transcription. *J Biol Chem* 286: 3798-804, 2011.
344. **Ammosova T, Obukhov Y, Kotelkin A, Breuer D, Beullens M, Gordeuk VR, Bollen M and Nekhai S**: Protein phosphatase-1 activates CDK9 by dephosphorylating Ser175. *PLoS One* 6: e18985, 2011.
345. **Fong YW and Zhou Q**: Relief of two built-in autoinhibitory mechanisms in P-TEFb is required for assembly of a multicomponent transcription elongation complex at the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol* 20: 5897-907, 2000.
346. **Garber ME, Mayall TP, Suess EM, Meisenhelder J, Thompson NE and Jones KA**: CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Mol Cell Biol* 20: 6958-69, 2000.
347. **Peng J, Zhu Y, Milton JT and Price DH**: Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 12: 755-62, 1998.
348. **Fu TJ, Peng J, Lee G, Price DH and Flores O**: Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* 274: 34527-30, 1999.
349. **Garriga J, Peng J, Parreno M, Price DH, Henderson EE and Grana X**: Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation. *Oncogene* 17: 3093-102, 1998.
350. **O'Keeffe B, Fong Y, Chen D, Zhou S and Zhou Q**: Requirement for a kinase-specific chaperone pathway in the production of a Cdk9/cyclin T1 heterodimer responsible for P-TEFb-mediated tat stimulation of HIV-1 transcription. *J Biol Chem* 275: 279-87, 2000.
351. **Ramanathan Y, Rajpara SM, Reza SM, Lees E, Shuman S, Mathews MB and Pe'ery T**: Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J Biol Chem* 276: 10913-20, 2001.
352. **Bartkowiak B and Greenleaf AL**: Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb? *Transcription* 2: 115-119, 2011.
353. **Bartkowiak B, Liu P, Phatnani HP, Fuda NJ, Cooper JJ, Price DH, Adelman K, Lis JT and Greenleaf AL**: CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev* 24: 2303-16, 2010.
354. **Czudnochowski N, Bosken CA and Geyer M**: Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. *Nat Commun* 3: 842, 2012.
355. **Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T and Handa H**: P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* 21: 227-37, 2006.
356. **Chen H, Contreras X, Yamaguchi Y, Handa H, Peterlin BM and Guo S**: Repression of RNA polymerase II elongation in vivo is critically dependent on the C-terminus of Spt5. *PLoS One* 4: e6918, 2009.
357. **Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T and Peterlin BM**: Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* 24: 787-95, 2004.
358. **Pirngruber J, Shchebet A, Schreiber L, Shema E, Minsky N, Chapman RD, Eick D, Aylon Y, Oren M and Johnsen SA**: CDK9 directs H2B monoubiquitination and controls replication-dependent histone mRNA 3'-end processing. *EMBO Rep* 10: 894-900, 2009.
359. **Shchebet A, Karpiuk O, Kremmer E, Eick D and Johnsen SA**: Phosphorylation by cyclin-dependent kinase-9 controls ubiquitin-conjugating enzyme-2A function. *Cell Cycle* 11: 2122-7, 2012.

360. **Chandrasekharan MB, Huang F and Sun ZW:** Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16686-91, 2009.
361. **Herrmann CH and Mancini MA:** The Cdk9 and cyclin T subunits of TAK/P-TEFb localize to splicing factor-rich nuclear speckle regions. *J Cell Sci* 114: 1491-503, 2001.
362. **Michels AA, Nguyen VT, Fraldi A, Labas V, Edwards M, Bonnet F, Lania L and Bensaude O:** MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol Cell Biol* 23: 4859-69, 2003.
363. **Nguyen VT, Kiss T, Michels AA and Bensaude O:** 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414: 322-5, 2001.
364. **Yik JH, Chen R, Nishimura R, Jennings JL, Link AJ and Zhou Q:** Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* 12: 971-82, 2003.
365. **Yang Z, Zhu Q, Luo K and Zhou Q:** The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 414: 317-22, 2001.
366. **Egloff S, Van Herreweghe E and Kiss T:** Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol Cell Biol* 26: 630-42, 2006.
367. **Michels AA, Fraldi A, Li Q, Adamson TE, Bonnet F, Nguyen VT, Sedore SC, Price JP, Price DH, Lania L and Bensaude O:** Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J* 23: 2608-19, 2004.
368. **Michels AA and Bensaude O:** RNA-driven cyclin-dependent kinase regulation: when CDK9/cyclin T subunits of P-TEFb meet their ribonucleoprotein partners. *Biotechnol J* 3: 1022-32, 2008.
369. **Barboric M, Kohoutek J, Price JP, Blazek D, Price DH and Peterlin BM:** Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *EMBO J* 24: 4291-303, 2005.
370. **Blazek D, Barboric M, Kohoutek J, Oven I and Peterlin BM:** Oligomerization of HEXIM1 via 7SK snRNA and coiled-coil region directs the inhibition of P-TEFb. *Nucleic Acids Res* 33: 7000-10, 2005.
371. **Dulac C, Michels AA, Fraldi A, Bonnet F, Nguyen VT, Napolitano G, Lania L and Bensaude O:** Transcription-dependent association of multiple positive transcription elongation factor units to a HEXIM multimer. *J Biol Chem* 280: 30619-29, 2005.
372. **Xue Y, Yang Z, Chen R and Zhou Q:** A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic Acids Res* 38: 360-9, 2010.
373. **He N, Jahchan NS, Hong E, Li Q, Bayfield MA, Maraia RJ, Luo K and Zhou Q:** A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Mol Cell* 29: 588-99, 2008.
374. **Bisgrove DA, Mahmoudi T, Henklein P and Verdin E:** Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13690-5, 2007.
375. **Wu SY and Chiang CM:** The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 282: 13141-5, 2007.
376. **Vollmuth F, Blankenfeldt W and Geyer M:** Structures of the dual bromodomains of the P-TEFb-activating protein Brd4 at atomic resolution. *J Biol Chem* 284: 36547-56, 2009.
377. **Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T and Ozato K:** The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8758-63, 2003.
378. **Dey A, Nishiyama A, Karpova T, McNally J and Ozato K:** Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol Biol Cell* 20: 4899-909, 2009.
379. **Yang Z, Yik JH, Chen R, He N, Jang MK, Ozato K and Zhou Q:** Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* 19: 535-45, 2005.
380. **Hargreaves DC, Horng T and Medzhitov R:** Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* 138: 129-45, 2009.
381. **Krueger BJ, Varzavand K, Cooper JJ and Price DH:** The mechanism of release of P-TEFb and HEXIM1 from the 7SK snRNP by viral and cellular activators includes a conformational change in 7SK. *PLoS One* 5: e12335, 2010.
382. **Barrandon C, Bonnet F, Nguyen VT, Labas V and Bensaude O:** The transcription-dependent dissociation of P-TEFb-HEXIM1-7SK RNA relies upon formation of hnRNP-7SK RNA complexes. *Mol Cell Biol* 27: 6996-7006, 2007.

383. **Van Herreweghe E, Egloff S, Goiffon I, Jady BE, Froment C, Monsarrat B and Kiss T:** Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb. *EMBO J* 26: 3570-80, 2007.
384. **Prasanth KV, Camiolo M, Chan G, Tripathi V, Denis L, Nakamura T, Hubner MR and Spector DL:** Nuclear organization and dynamics of 7SK RNA in regulating gene expression. *Mol Biol Cell* 21: 4184-96, 2010.
385. **Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB and Price DH:** Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* 11: 2622-32, 1997.
386. **Mancebo HS, Lee G, Flygare J, Tomassini J, Luu P, Zhu Y, Peng J, Blau C, Hazuda D, Price D and Flores O:** P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev* 11: 2633-44, 1997.
387. **Ali A, Ghosh A, Nathans RS, Sharova N, O'Brien S, Cao H, Stevenson M and Rana TM:** Identification of flavopiridol analogues that selectively inhibit positive transcription elongation factor (P-TEFb) and block HIV-1 replication. *Chembiochem* 10: 2072-80, 2009.
388. **Zhou Q, Chen D, Pierstorff E and Luo K:** Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages. *EMBO J* 17: 3681-91, 1998.
389. **Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP and Cullen BR:** Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7791-6, 1999.
390. **Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH and Jones KA:** A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92: 451-62, 1998.
391. **D'Orso I and Frankel AD:** RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat Struct Mol Biol* 17: 815-21, 2010.
392. **Muniz L, Egloff S, Ughy B, Jady BE and Kiss T:** Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat. *PLoS Pathog* 6: e1001152, 2010.
393. **Tahirov TH, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC and Price DH:** Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 465: 747-51, 2010.
394. **Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K and Okamoto T:** Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. *J Mol Biol* 410: 887-95, 2011.
395. **Garber ME, Wei P, KewalRamani VN, Mayall TP, Herrmann CH, Rice AP, Littman DR and Jones KA:** The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev* 12: 3512-27, 1998.
396. **Anand K, Schulte A, Fujinaga K, Scheffzek K and Geyer M:** Cyclin box structure of the P-TEFb subunit cyclin T1 derived from a fusion complex with EIAV tat. *J Mol Biol* 370: 826-36, 2007.
397. **Liou LY, Herrmann CH and Rice AP:** Human immunodeficiency virus type 1 infection induces cyclin T1 expression in macrophages. *J Virol* 78: 8114-9, 2004.
398. **Hoque M, Shamanna RA, Guan D, Pe'ery T and Mathews MB:** HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1. *J Mol Biol* 410: 917-32, 2011.
399. **Imai K, Asamitsu K, Victoriano AF, Cueno ME, Fujinaga K and Okamoto T:** Cyclin T1 stabilizes expression levels of HIV-1 Tat in cells. *FEBS J* 276: 7124-33, 2009.
400. **Khan SZ and Mitra D:** Cyclin K inhibits HIV-1 gene expression and replication by interfering with cyclin-dependent kinase 9 (CDK9)-cyclin T1 interaction in Nef-dependent manner. *J Biol Chem* 286: 22943-54, 2011.
401. **Yedavalli VS, Benkirane M and Jeang KT:** Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *J Biol Chem* 278: 6404-10, 2003.
402. **Marcello A, Cinelli RA, Ferrari A, Signorelli A, Tyagi M, Pellegrini V, Beltram F and Giacca M:** Visualization of in vivo direct interaction between HIV-1 TAT and human cyclin T1 in specific subcellular compartments by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276: 39220-5, 2001.
403. **Schulte A, Czudnochowski N, Barboric M, Schonichen A, Blazek D, Peterlin BM and Geyer M:** Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 280: 24968-77, 2005.
404. **Kuzmina A, Hadad U, Fujinaga K and Taube R:** Functional characterization of a human cyclin T1 mutant reveals a different binding surface for Tat and HEXIM1. *Virology* 426: 152-61, 2012.
405. **Barboric M, Yik JH, Czudnochowski N, Yang Z, Chen R, Contreras X, Geyer M, Matija Peterlin B and Zhou Q:** Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res* 35: 2003-12, 2007.

406. **Contreras X, Barboric M, Lenasi T and Peterlin BM:** HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription. *PLoS Pathog* 3: 1459-69, 2007.
407. **Choudhary SK, Archin NM and Margolis DM:** Hexamethylbisacetamide and disruption of human immunodeficiency virus type 1 latency in CD4(+) T cells. *J Infect Dis* 197: 1162-70, 2008.
408. **Fraldi A, Varrone F, Napolitano G, Michels AA, Majello B, Bensaude O and Lania L:** Inhibition of Tat activity by the HEXIM1 protein. *Retrovirology* 2: 42, 2005.
409. **Sedore SC, Byers SA, Biglione S, Price JP, Maury WJ and Price DH:** Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. *Nucleic Acids Res* 35: 4347-58, 2007.
410. **Markert A, Grimm M, Martinez J, Wiesner J, Meyerhans A, Meyuhas O, Sickmann A and Fischer U:** The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep* 9: 569-75, 2008.
411. **Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N and Komano J:** Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett* 582: 4053-8, 2008.
412. **Hoque M, Mathews MB and Pe'ery T:** Progranulin (granulin/epithelin precursor) and its constituent granulin repeats repress transcription from cellular promoters. *J Cell Physiol* 223: 224-33, 2010.
413. **Bartholomeeusen K, Xiang Y, Fujinaga K and Peterlin BM:** Bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain inhibition activate transcription via transient release of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from 7SK small nuclear ribonucleoprotein. *J Biol Chem* 287: 36609-16, 2012.
414. **Zhou M, Halanski MA, Radonovich MF, Kashanchi F, Peng J, Price DH and Brady JN:** Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* 20: 5077-86, 2000.
415. **Ping YH and Rana TM:** DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *J Biol Chem* 276: 12951-8, 2001.
416. **Zhou M, Deng L, Lacoste V, Park HU, Pumfery A, Kashanchi F, Brady JN and Kumar A:** Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb kinase during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Virol* 78: 13522-33, 2004.
417. **He N, Liu M, Hsu J, Xue Y, Chou S, Burlingame A, Krogan NJ, Alber T and Zhou Q:** HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Mol Cell* 38: 428-38, 2010.
418. **Sobhian B, Laguette N, Yatim A, Nakamura M, Levy Y, Kiernan R and Benkirane M:** HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Mol Cell* 38: 439-51, 2010.
419. **O'Brien SK, Cao H, Nathans R, Ali A and Rana TM:** P-TEFb kinase complex phosphorylates histone H1 to regulate expression of cellular and HIV-1 genes. *J Biol Chem* 285: 29713-20, 2010.
420. **Zhou M, Deng L, Kashanchi F, Brady JN, Shatkin AJ and Kumar A:** The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12666-71, 2003.
421. **Zhou M, Lu H, Park H, Wilson-Chiru J, Linton R and Brady JN:** Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J Virol* 80: 4781-91, 2006.
422. **Zhou M, Nekhai S, Bharucha DC, Kumar A, Ge H, Price DH, Egly JM and Brady JN:** TFIIH inhibits CDK9 phosphorylation during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Biol Chem* 276: 44633-40, 2001.
423. **Zhou M, Huang K, Jung KJ, Cho WK, Klase Z, Kashanchi F, Pise-Masison CA and Brady JN:** Bromodomain protein Brd4 regulates human immunodeficiency virus transcription through phosphorylation of CDK9 at threonine 29. *J Virol* 83: 1036-44, 2009.
424. **Martinez AM, Afshar M, Martin F, Cavadore JC, Labbe JC and Doree M:** Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J* 16: 343-54, 1997.
425. **Larochelle S, Chen J, Knights R, Pandur J, Morcillo P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Suter B and Fisher RP:** T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7-cyclin H-MAT1 complex in vivo and regulates its CTD kinase activity. *EMBO J* 20: 3749-59, 2001.
426. **Kiernan RE, Emiliani S, Nakayama K, Castro A, Labbe JC, Lorca T, Nakayama Ki K and Benkirane M:** Interaction between cyclin T1 and SCF(SKP2) targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* 21: 7956-70, 2001.

427. **Rechsteiner M and Rogers SW:** PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71, 1996.
428. **Barboric M, Zhang F, Besenicar M, Plemenitas A and Peterlin BM:** Ubiquitylation of Cdk9 by Skp2 facilitates optimal Tat transactivation. *J Virol* 79: 11135-41, 2005.
429. **Lau J, Lew QJ, Diribarne G, Michels AA, Dey A, Bensaude O, Lane DP and Chao SH:** Ubiquitination of HEXIM1 by HDM2. *Cell Cycle* 8: 2247-54, 2009.
430. **Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV and Mann M:** Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325: 834-40, 2009.
431. **Cho S, Schroeder S, Kaehlcke K, Kwon HS, Pedal A, Herker E, Schnoelzer M and Ott M:** Acetylation of cyclin T1 regulates the equilibrium between active and inactive P-TEFb in cells. *EMBO J* 28: 1407-17, 2009.
432. **Fu J, Yoon HG, Qin J and Wong J:** Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. *Mol Cell Biol* 27: 4641-51, 2007.
433. **Sabo A, Lusic M, Cereseto A and Giacca M:** Acetylation of conserved lysines in the catalytic core of cyclin-dependent kinase 9 inhibits kinase activity and regulates transcription. *Mol Cell Biol* 28: 2201-12, 2008.
434. **Yu DS and Cortez D:** A role for CDK9-cyclin K in maintaining genome integrity. *Cell Cycle* 10: 28-32, 2011.
435. **Shore SM, Byers SA, Maury W and Price DH:** Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene* 307: 175-82, 2003.
436. **De Luca A, Russo P, Severino A, Baldi A, Battista T, Cavallotti I, De Luca L, Baldi F, Giordano A and Paggi MG:** Pattern of expression of cyclin T1 in human tissues. *J Histochem Cytochem* 49: 685-92, 2001.
437. **Martin-Serrano J, Li K and Bieniasz PD:** Cyclin T1 expression is mediated by a complex and constitutively active promoter and does not limit human immunodeficiency virus type 1 Tat function in unstimulated primary lymphocytes. *J Virol* 76: 208-19, 2002.
438. **Herrmann CH, Carroll RG, Wei P, Jones KA and Rice AP:** Tat-associated kinase, TAK, activity is regulated by distinct mechanisms in peripheral blood lymphocytes and promonocytic cell lines. *J Virol* 72: 9881-8, 1998.
439. **Yu W, Wang Y, Shaw CA, Qin XF and Rice AP:** Induction of the HIV-1 Tat co-factor cyclin T1 during monocyte differentiation is required for the regulated expression of a large portion of cellular mRNAs. *Retrovirology* 3: 32, 2006.
440. **Sung TL and Rice AP:** miR-198 inhibits HIV-1 gene expression and replication in monocytes and its mechanism of action appears to involve repression of cyclin T1. *PLoS Pathog* 5: e1000263, 2009.
441. **Chiang K, Sung TL and Rice AP:** Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 86: 3244-52, 2012.
442. **Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R and Young RA:** A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130: 77-88, 2007.
443. **Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, Sharp PA and Young RA:** c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141: 432-45, 2010.
444. **Nechaev S and Adelman K:** Promoter-proximal Pol II: when stalling speeds things up. *Cell Cycle* 7: 1539-44, 2008.
445. **Singh J and Padgett RA:** Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1128-33, 2009.
446. **Gu W and Reines D:** Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 270: 11238-44, 1995.
447. **Sigurdsson S, Dirac-Svejstrup AB and Svejstrup JQ:** Evidence that transcript cleavage is essential for RNA polymerase II transcription and cell viability. *Mol Cell* 38: 202-10, 2010.
448. **Fish RN and Kane CM:** Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim Biophys Acta* 1577: 287-307, 2002.
449. **Rasmussen EB and Lis JT:** Short transcripts of the ternary complex provide insight into RNA polymerase II elongational pausing. *J Mol Biol* 252: 522-35, 1995.
450. **Nechaev S, Fargo DC, dos Santos G, Liu L, Gao Y and Adelman K:** Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* 327: 335-8, 2010.
451. **Flores O, Maldonado E and Reinberg D:** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Factors IIE and IIF independently interact with RNA polymerase II. *J Biol Chem* 264: 8913-21, 1989.

452. **Cojocar M, Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Bergeron D, Cote P, Poirier GG, Greenblatt J and Coulombe B:** Genomic location of the human RNA polymerase II general machinery: evidence for a role of TFIIF and Rpb7 at both early and late stages of transcription. *Biochem J* 409: 139-47, 2008.
453. **Price DH, Sluder AE and Greenleaf AL:** Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 9: 1465-75, 1989.
454. **Shilatifard A, Lane WS, Jackson KW, Conaway RC and Conaway JW:** An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science* 271: 1873-6, 1996.
455. **Thirman MJ, Levitan DA, Kobayashi H, Simon MC and Rowley JD:** Cloning of ELL, a gene that fuses to MLL in a t(11;19)(q23;p13.1) in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12110-4, 1994.
456. **Shilatifard A, Haque D, Conaway RC and Conaway JW:** Structure and function of RNA polymerase II elongation factor ELL. Identification of two overlapping ELL functional domains that govern its interaction with polymerase and the ternary elongation complex. *J Biol Chem* 272: 22355-63, 1997.
457. **Schmidt AE, Miller T, Schmidt SL, Shiekhattar R and Shilatifard A:** Cloning and characterization of the EAP30 subunit of the ELL complex that confers derepression of transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 274: 21981-5, 1999.
458. **Simone F, Polak PE, Kaberlein JJ, Luo RT, Levitan DA and Thirman MJ:** EAF1, a novel ELL-associated factor that is delocalized by expression of the MLL-ELL fusion protein. *Blood* 98: 201-9, 2001.
459. **Simone F, Luo RT, Polak PE, Kaberlein JJ and Thirman MJ:** ELL-associated factor 2 (EAF2), a functional homolog of EAF1 with alternative ELL binding properties. *Blood* 101: 2355-62, 2003.
460. **Shinobu N, Maeda T, Aso T, Ito T, Kondo T, Koike K and Hatakeyama M:** Physical interaction and functional antagonism between the RNA polymerase II elongation factor ELL and p53. *J Biol Chem* 274: 17003-10, 1999.
461. **Byun JS, Fufa TD, Wakano C, Fernandez A, Haggerty CM, Sung MH and Gardner K:** ELL facilitates RNA polymerase II pause site entry and release. *Nat Commun* 3: 633, 2012.
462. **Rondon AG, Gallardo M, Garcia-Rubio M and Aguilera A:** Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation. *EMBO Rep* 5: 47-53, 2004.
463. **Chen Y, Yamaguchi Y, Tsugeno Y, Yamamoto J, Yamada T, Nakamura M, Hisatake K and Handa H:** DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have nonredundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation. *Genes Dev* 23: 2765-77, 2009.
464. **Kim J, Guermah M and Roeder RG:** The human PAF1 complex acts in chromatin transcription elongation both independently and cooperatively with SII/TFIIS. *Cell* 140: 491-503, 2010.
465. **Mueller CL and Jaehning JA:** Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Mol Cell Biol* 22: 1971-80, 2002.
466. **Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Ryan OW, Golshani A, Johnston M, Greenblatt JF and Shilatifard A:** The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* 11: 721-9, 2003.
467. **Ng HH, Dole S and Struhl K:** The Rtf1 component of the Paf1 transcriptional elongation complex is required for ubiquitination of histone H2B. *J Biol Chem* 278: 33625-8, 2003.
468. **Larabee RN, Krogan NJ, Xiao T, Shibata Y, Hughes TR, Greenblatt JF and Strahl BD:** BUR kinase selectively regulates H3 K4 trimethylation and H2B ubiquitylation through recruitment of the PAF elongation complex. *Curr Biol* 15: 1487-93, 2005.
469. **Milne TA, Kim J, Wang GG, Stadler SC, Basrur V, Whitcomb SJ, Wang Z, Ruthenburg AJ, Elenitoba-Johnson KS, Roeder RG and Allis CD:** Multiple interactions recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the HOXA9 locus in leukemogenesis. *Mol Cell* 38: 853-63, 2010.
470. **Muntean AG, Tan J, Sitwala K, Huang Y, Bronstein J, Connelly JA, Basrur V, Elenitoba-Johnson KS and Hess JL:** The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis. *Cancer Cell* 17: 609-21, 2010.
471. **Wu J, Cui N, Wang R, Li J and Wong J:** A role for CARM1-mediated histone H3 arginine methylation in protecting histone acetylation by releasing corepressors from chromatin. *PLoS One* 7: e34692, 2012.
472. **Penheiter KL, Washburn TM, Porter SE, Hoffman MG and Jaehning JA:** A posttranscriptional role for the yeast Paf1-RNA polymerase II complex is revealed by identification of primary targets. *Mol Cell* 20: 213-23, 2005.

473. **Nordick K, Hoffman MG, Betz JL and Jaehning JA:** Direct interactions between the Paf1 complex and a cleavage and polyadenylation factor are revealed by dissociation of Paf1 from RNA polymerase II. *Eukaryot Cell* 7: 1158-67, 2008.
474. **Rozenblatt-Rosen O, Nagaike T, Francis JM, Kaneko S, Glatt KA, Hughes CM, LaFramboise T, Manley JL and Meyerson M:** The tumor suppressor Cdc73 functionally associates with CPSF and CstF 3' mRNA processing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 755-60, 2009.
475. **Moniaux N, Nemos C, Deb S, Zhu B, Dornreiter I, Hollingsworth MA and Batra SK:** The human RNA polymerase II-associated factor 1 (hPaf1): a new regulator of cell-cycle progression. *PLoS One* 4: e7077, 2009.
476. **Lin C, Smith ER, Takahashi H, Lai KC, Martin-Brown S, Florens L, Washburn MP, Conaway JW, Conaway RC and Shilatifard A:** AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell* 37: 429-37, 2010.
477. **Smith E, Lin C and Shilatifard A:** The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes Dev* 25: 661-72, 2011.
478. **Luo Z, Lin C, Guest E, Garrett AS, Mohaghegh N, Swanson S, Marshall S, Florens L, Washburn MP and Shilatifard A:** The super elongation complex family of RNA polymerase II elongation factors: gene target specificity and transcriptional output. *Mol Cell Biol* 32: 2608-17, 2012.
479. **Lin C, Garrett AS, De Kumar B, Smith ER, Gogol M, Seidel C, Krumlauf R and Shilatifard A:** Dynamic transcriptional events in embryonic stem cells mediated by the super elongation complex (SEC). *Genes Dev* 25: 1486-98, 2011.
480. **Gilmour DS:** Promoter proximal pausing on genes in metazoans. *Chromosoma* 118: 1-10, 2009.
481. **Levine M:** Paused RNA polymerase II as a developmental checkpoint. *Cell* 145: 502-11, 2011.
482. **Boettiger AN and Levine M:** Synchronous and stochastic patterns of gene activation in the *Drosophila* embryo. *Science* 325: 471-3, 2009.
483. **Zhou Q, Li T and Price DH:** RNA polymerase II elongation control. *Annu Rev Biochem* 81: 119-43, 2012.
484. **He N, Chan CK, Sobhian B, Chou S, Xue Y, Liu M, Alber T, Benkirane M and Zhou Q:** Human Polymerase-Associated Factor complex (PAFc) connects the Super Elongation Complex (SEC) to RNA polymerase II on chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E636-45, 2011.
485. **Bursen A, Moritz S, Gaussmann A, Dingermann T and Marschalek R:** Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* 23: 6237-49, 2004.
486. **Benedikt A, Baltruschat S, Scholz B, Bursen A, Arrey TN, Meyer B, Varagnolo L, Muller AM, Karas M, Dingermann T and Marschalek R:** The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures. *Leukemia* 25: 135-44, 2011.
487. **Takahashi H, Parmely TJ, Sato S, Tomomori-Sato C, Banks CA, Kong SE, Szutorisz H, Swanson SK, Martin-Brown S, Washburn MP, Florens L, Seidel CW, Lin C, Smith ER, Shilatifard A, Conaway RC and Conaway JW:** Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell* 146: 92-104, 2011.
488. **Smith ER, Lin C, Garrett AS, Thornton J, Mohaghegh N, Hu D, Jackson J, Saraf A, Swanson SK, Seidel C, Florens L, Washburn MP, Eissenberg JC and Shilatifard A:** The little elongation complex regulates small nuclear RNA transcription. *Mol Cell* 44: 954-65, 2011.
489. **Niehrs C and Schafer A:** Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol* 22: 220-7, 2012.
490. **Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PA, Rappsilber J and Helin K:** TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 473: 343-8, 2011.
491. **Biniszkiwicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, Gaudet F, Eggan K, Humpherys D, Mastrangelo MA, Jun Z, Walter J and Jaenisch R:** Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 22: 2124-35, 2002.
492. **Benvenisty N and Reshef L:** Developmental expression and modification of genes. *Biol Neonate* 52: 61-9, 1987.
493. **Senner CE:** The role of DNA methylation in mammalian development. *Reprod Biomed Online* 22: 529-35, 2011.
494. **Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA and Gehrke C:** Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10: 2709-21, 1982.

495. **Herman JG and Baylin SB**: Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 249: 35-54, 2000.
496. **Ehrlich M and Lacey M**: DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Adv Exp Med Biol* 754: 31-56, 2013.
497. **Felsenfeld G and Groudine M**: Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-53, 2003.
498. **Martin C and Zhang Y**: The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 838-49, 2005.
499. **Kouzarides T**: Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705, 2007.
500. **Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA and Casero RA**: Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941-53, 2004.
501. **Klose RJ, Kallin EM and Zhang Y**: JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7: 715-27, 2006.
502. **Shi Y and Whetstine JR**: Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell* 25: 1-14, 2007.
503. **Mosammaparast N and Shi Y**: Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem* 79: 155-79, 2010.
504. **Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH and Helin K**: Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 20: 1123-36, 2006.
505. **Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H and Bernstein BE**: Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* 4: e1000242, 2008.
506. **Wilson AG**: Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol* 79: 1514-9, 2008.
507. **Bell CG and Beck S**: The epigenomic interface between genome and environment in common complex diseases. *Brief Funct Genomics* 9: 477-85, 2010.
508. **Khare SP, Habib F, Sharma R, Gadwal N, Gupta S and Galande S**: Histone--a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes. *Nucleic Acids Res* 40: D337-42, 2012.
509. **Smallwood A, Esteve PO, Pradhan S and Carey M**: Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* 21: 1169-78, 2007.
510. **Scholz B and Marschalek R**: Epigenetics and blood disorders. *Br J Haematol* 158: 307-22, 2012.
511. **Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N, Gale RP, Lange B, Crist WM, Nowell PC and et al.**: Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4631-5, 1993.
512. **Taki T, Kano H, Taniwaki M, Sako M, Yanagisawa M and Hayashi Y**: AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14535-40, 1999.
513. **von Bergh AR, Beverloo HB, Rombout P, van Wering ER, van Weel MH, Beverstock GC, Kluin PM, Slater RM and Schuurin E**: LAF4, an AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 92-6, 2002.
514. **Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, Jockel J, Johansen L, Silverman GA, Kersey JH and Korsmeyer SJ**: Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7884-8, 1993.
515. **Downing JR, Head DR, Raimondi SC, Carroll AJ, Curcio-Brint AM, Motroni TA, Hulshof MG, Pullen DJ and Domer PH**: The der(11)-encoded MLL/AF-4 fusion transcript is consistently detected in t(4;11)(q21;q23)-containing acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 83: 330-5, 1994.
516. **Borkhardt A, Repp R, Haupt E, Brettreich S, Buchen U, Gossen R and Lampert F**: Molecular analysis of MLL-1/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 8: 549-53, 1994.
517. **Hilden JM, Frestedt JL, Moore RO, Heerema NA, Arthur DC, Reaman GH and Kersey JH**: Molecular analysis of infant acute lymphoblastic leukemia: MLL gene rearrangement and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for t(4; 11)(q21; q23). *Blood* 86: 3876-82, 1995.
518. **Bursen A, Schwabe K, Ruster B, Henschler R, Ruthardt M, Dingermann T and Marschalek R**: The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* 115: 3570-9, 2010.
519. **Gaussmann A, Wenger T, Eberle I, Bursen A, Bracharz S, Herr I, Dingermann T and Marschalek R**: Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL

- confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene* 26: 3352-63, 2007.
520. **Sanders DS, Muntean AG and Hess JL:** Significance of AF4-MLL reciprocal fusion in t(4;11) leukemias? *Leuk Res* 35: 299-300, 2011.
521. **Kumar AR, Yao Q, Li Q, Sam TA and Kersey JH:** t(4;11) leukemias display addiction to MLL-AF4 but not to AF4-MLL. *Leuk Res* 35: 305-9, 2011.
522. **Marschalek R:** It takes two-to-leukemia: about addictions and requirements. *Leuk Res* 35: 424-5, 2011.
523. **Blutters-Sawatzki R, Borkhardt A, Grathwohl J, Repp R, Rheinisch-Becker I, Bohle RM and Lampert F:** Secondary acute myeloid leukemia with translocation (4;11) and MLL/AF4 rearrangement in a 15-year-old boy treated for common acute lymphoblastic leukemia 11 years earlier. *Ann Hematol* 70: 31-5, 1995.
524. **Lovett BD, Lo Nigro L, Rappaport EF, Blair IA, Osheroff N, Zheng N, Megonigal MD, Williams WR, Nowell PC and Felix CA:** Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at MLL and AF-4 genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9802-7, 2001.
525. **Cowell IG, Sondka Z, Smith K, Lee KC, Manville CM, Sidorcuk-Lesthuruge M, Rance HA, Padget K, Jackson GH, Adachi N and Austin CA:** Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase IIbeta-mediated DNA strand breaks and gene proximity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 8989-94, 2012.
526. **Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y, Leshkowitz D, Croce CM and Canaani E:** Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12160-4, 1995.
527. **Morrissey JJ, Raney S and Cleary ML:** The FEL (AF-4) protein donates transcriptional activation sequences to Hrx-Fel fusion proteins in leukemias containing T(4;11)(Q21;Q23) chromosomal translocations. *Leuk Res* 21: 911-7, 1997.
528. **Ma C and Staudt LM:** LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* 87: 734-45, 1996.
529. **Frestedt JL, Hilden JM and Kersey JH:** AF4/FEL, a gene involved in infant leukemia: sequence variations, gene structure, and possible homology with a genomic sequence on 5q31. *DNA Cell Biol* 15: 669-78, 1996.
530. **Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB and Greaves MF:** Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13950-4, 1997.
531. **Flicek P, Ahmed I, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, Garcia-Giron C, Gordon L, Hourlier T, Hunt S, Juettemann T, Kahari AK, Keenan S, Komorowska M, Kulesha E, Longden I, Maurel T, McLaren WM, Muffato M, Nag R, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Pritchard E, Riat HS, Ritchie GR, Ruffier M, Schuster M, Sheppard D, Sobral D, Taylor K, Thormann A, Trevanion S, White S, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJ, Johnson N, Kinsella R, Parker A, Spudich G, Yates A, Zadissa A and Searle SM:** Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res* 41: D48-55, 2013.
532. **Nilson I, Reichel M, Ennas MG, Greim R, Knorr C, Siegler G, Greil J, Fey GH and Marschalek R:** Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* 98: 157-69, 1997.
533. **Li Q, Frestedt JL and Kersey JH:** AF4 encodes a ubiquitous protein that in both native and MLL-AF4 fusion types localizes to subnuclear compartments. *Blood* 92: 3841-7, 1998.
534. **Isnard P, Core N, Naquet P and Djabali M:** Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* 96: 705-10, 2000.
535. **Baskaran K, Erfurth F, Taborn G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Iannaccone PM and Domer PH:** Cloning and developmental expression of the murine homolog of the acute leukemia proto-oncogene AF4. *Oncogene* 15: 1967-78, 1997.
536. **Erfurth F, Hemenway CS, de Erkenez AC and Domer PH:** MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* 18: 92-102, 2004.
537. **Zeisig DT, Bittner CB, Zeisig BB, Garcia-Cuellar MP, Hess JL and Slany RK:** The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* 24: 5525-32, 2005.
538. **Srinivasan RS, Nesbit JB, Marrero L, Erfurth F, LaRussa VF and Hemenway CS:** The synthetic peptide PFWT disrupts AF4-AF9 protein complexes and induces apoptosis in t(4;11) leukemia cells. *Leukemia* 18: 1364-72, 2004.

539. **Estable MC, Naghavi MH, Kato H, Xiao H, Qin J, Vahlne A and Roeder RG:** MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. *J Biomed Sci* 9: 234-45, 2002.
540. **Isaacs AM, Oliver PL, Jones EL, Jeans A, Potter A, Hovik BH, Nolan PM, Vizor L, Glenister P, Simon AK, Gray IC, Spurr NK, Brown SD, Hunter AJ and Davies KE:** A mutation in Af4 is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J Neurosci* 23: 1631-7, 2003.
541. **Oliver PL, Bitoun E, Clark J, Jones EL and Davies KE:** Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14901-6, 2004.
542. **Bitoun E, Finelli MJ, Oliver PL, Lee S and Davies KE:** AF4 is a critical regulator of the IGF-1 signaling pathway during Purkinje cell development. *J Neurosci* 29: 15366-74, 2009.
543. **Liu M, Hsu J, Chan C, Li Z and Zhou Q:** The ubiquitin ligase Siah1 controls ELL2 stability and formation of super elongation complexes to modulate gene transcription. *Mol Cell* 46: 325-34, 2012.
544. **Bitoun E, Oliver PL and Davies KE:** The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet* 16: 92-106, 2007.
545. **Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I and Cleary ML:** A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell* 17: 198-212, 2010.
546. **Esposito G, Cevenini A, Cuomo A, de Falco F, Sabbatino D, Pane F, Ruoppolo M and Salvatore F:** Protein network study of human AF4 reveals its central role in RNA Pol II-mediated transcription and in phosphorylation-dependent regulatory mechanisms. *Biochem J* 438: 121-31, 2011.
547. **Biswas D, Milne TA, Basur V, Kim J, Elenitoba-Johnson KS, Allis CD and Roeder RG:** Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15751-6, 2011.
548. **Luo RT, Lavau C, Du C, Simone F, Polak PE, Kawamata S and Thirman MJ:** The elongation domain of ELL is dispensable but its ELL-associated factor 1 interaction domain is essential for MLL-ELL-induced leukemogenesis. *Mol Cell Biol* 21: 5678-87, 2001.
549. **Melko M, Douguet D, Bensaïd M, Zongaro S, Verheggen C, Gecz J and Bardoni B:** Functional characterization of the AFF (AF4/FMR2) family of RNA-binding proteins: insights into the molecular pathology of FRAXE intellectual disability. *Hum Mol Genet* 20: 1873-85, 2011.
550. **Ng MH, Ng RK, Kong CT, Jin DY and Chan LC:** Activation of Ras-dependent Elk-1 activity by MLL-AF4 family fusion oncoproteins. *Exp Hematol* 38: 481-8, 2010.
551. **Mak AB, Nixon AM and Moffat J:** The mixed lineage leukemia (MLL) fusion-associated gene AF4 promotes CD133 transcription. *Cancer Res* 72: 1929-34, 2012.
552. **Chi T, Lieberman P, Ellwood K and Carey M:** A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature* 377: 254-7, 1995.
553. **Kobayashi N, Boyer TG and Berk AJ:** A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly. *Mol Cell Biol* 15: 6465-73, 1995.
554. **zur Hausen H:** Viruses in human cancers. *Science* 254: 1167-73, 1991.
555. **Chen DH, Jiang H, Lee M, Liu F and Zhou ZH:** Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* 260: 10-6, 1999.
556. **Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, McGeoch DJ and Hayward GS:** The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 84: 17-28, 2003.
557. **Wright HT, Jr., Goodheart CR and Lielausis A:** Human Cytomegalovirus. Morphology by Negative Staining. *Virology* 23: 419-24, 1964.
558. **McGavran MH and Smith MG:** Ultrastructural, Cytochemical, and Microchemical Observations on Cytomegalovirus (Salivary Gland Virus) Infection of Human Cells in Tissue Culture. *Exp Mol Pathol* 76: 1-10, 1965.
559. **Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, Wang D, Camp DG, 2nd, Rodland K, Wiley S, Britt W, Shenk T, Smith RD and Nelson JA:** Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 78: 10960-6, 2004.
560. **Stinski MF:** Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol* 26: 686-701, 1978.
561. **Sia IG and Patel R:** New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 13: 83-121, table of contents, 2000.

562. **Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF and Cannon MJ:** Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* 43: 1143-51, 2006.
563. **Sinclair J and Sissons P:** Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 87: 1763-79, 2006.
564. **Maciejewski JP and St Jeor SC:** Human cytomegalovirus infection of human hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 33: 1-13, 1999.
565. **Ibanez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C and Nelson JA:** Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* 65: 6581-8, 1991.
566. **Isaacson MK, Juckem LK and Compton T:** Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 85-100, 2008.
567. **Sinzger C, Bissinger AL, Viebahn R, Oettle H, Radke C, Schmidt CA and Jahn G:** Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and *In vivo*. *J Infect Dis* 180: 976-86, 1999.
568. **Rummelt V, Rummelt C, Jahn G, Wenkel H, Sinzger C, Mayer UM and Naumann GO:** Triple retinal infection with human immunodeficiency virus type 1, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1. Light and electron microscopy, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization. *Ophthalmology* 101: 270-9, 1994.
569. **Rosenthal LJ, Panitz PJ, Crutchfield DB and Chou JY:** Cytomegalovirus replication in primary and passaged human placental cells. *Intervirology* 16: 168-75, 1981.
570. **Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschnig M, Desoye G, Hahn T, Kiesel L, Klingel K, Rieger P, Jahn G and Sinzger C:** Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Virol* 72: 7598-602, 1998.
571. **Liu B and Stinski MF:** Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* 66: 4434-44, 1992.
572. **Stenberg RM, Fortney J, Barlow SW, Magrane BP, Nelson JA and Ghazal P:** Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains. *J Virol* 64: 1556-65, 1990.
573. **Pizzorno MC, O'Hare P, Sha L, LaFemina RL and Hayward GS:** trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J Virol* 62: 1167-79, 1988.
574. **Hermiston TW, Malone CL and Stinski MF:** Human cytomegalovirus immediate-early two protein region involved in negative regulation of the major immediate-early promoter. *J Virol* 64: 3532-6, 1990.
575. **Sindre H, Tjoonfjord GE, Rollag H, Ranneberg-Nilsen T, Veiby OP, Beck S, Degre M and Hestdal K:** Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88: 4526-33, 1996.
576. **Hahn G, Jores R and Mocarski ES:** Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3937-42, 1998.
577. **Mayo DR, Armstrong JA and Ho M:** Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature* 267: 721-3, 1977.
578. **Docke WD, Prosch S, Fietze E, Kimel V, Zuckermann H, Klug C, Syrbe U, Kruger DH, von Baehr R and Volk HD:** Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet* 343: 268-9, 1994.
579. **Taylor-Wiedeman J, Sissons P and Sinclair J:** Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol* 68: 1597-604, 1994.
580. **Jahn G, Knust E, Schmolla H, Sarre T, Nelson JA, McDougall JK and Fleckenstein B:** Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus AD 169. *J Virol* 49: 363-70, 1984.
581. **Michelson S, Horodniceanu F, Kress M and Tardy-Panit M:** Human cytomegalovirus-induced immediate early antigens: analysis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis after immunoprecipitation. *J Virol* 32: 259-67, 1979.
582. **Otto SM, Sullivan-Tailyour G, Malone CL and Stinski MF:** Subcellular localization of the major immediate early protein (IE1) of human cytomegalovirus at early times after infection. *Virology* 162: 478-82, 1988.
583. **Blanton RA and Tevethia MJ:** Immunoprecipitation of virus-specific immediate-early and early polypeptides from cells lytically infected with human cytomegalovirus strain AD 169. *Virology* 112: 262-73, 1981.

584. **Stenberg RM, Depto AS, Fortney J and Nelson JA:** Regulated expression of early and late RNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region. *J Virol* 63: 2699-708, 1989.
585. **Stenberg RM, Witte PR and Stinski MF:** Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. *J Virol* 56: 665-75, 1985.
586. **Baracchini E, Glezer E, Fish K, Stenberg RM, Nelson JA and Ghazal P:** An isoform variant of the cytomegalovirus immediate-early auto repressor functions as a transcriptional activator. *Virology* 188: 518-29, 1992.
587. **Davis MG, Kenney SC, Kamine J, Pagano JS and Huang ES:** Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8642-6, 1987.
588. **Depto AS and Stenberg RM:** Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products. *J Virol* 63: 1232-8, 1989.
589. **Malone CL, Vesole DH and Stinski MF:** Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins. *J Virol* 64: 1498-506, 1990.
590. **Lukac DM, Manuppello JR and Alwine JC:** Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex. *J Virol* 68: 5184-93, 1994.
591. **White EA and Spector DH:** Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. *J Virol* 79: 7438-52, 2005.
592. **Straat K, Liu C, Rahbar A, Zhu Q, Liu L, Wolmer-Solberg N, Lou F, Liu Z, Shen J, Jia J, Kyo S, Bjorkholm M, Sjoberg J, Soderberg-Naucler C and Xu D:** Activation of telomerase by human cytomegalovirus. *J Natl Cancer Inst* 101: 488-97, 2009.
593. **Hayhurst GP, Bryant LA, Caswell RC, Walker SM and Sinclair JH:** CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein. *J Virol* 69: 182-8, 1995.
594. **Pajovic S, Wong EL, Black AR and Azizkhan JC:** Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins. *Mol Cell Biol* 17: 6459-64, 1997.
595. **Kronsnabl M and Stamminger T:** Synergistic induction of intercellular adhesion molecule-1 by the human cytomegalovirus transactivators IE2p86 and pp71 is mediated via an Sp1-binding site. *J Gen Virol* 84: 61-73, 2003.
596. **Yurochko AD, Mayo MW, Poma EE, Baldwin AS, Jr. and Huang ES:** Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J Virol* 71: 4638-48, 1997.
597. **Mocarski ES, Jr.:** Biology and replication of cytomegalovirus. *Transfus Med Rev* 2: 229-34, 1988.
598. **Bresnahan WA, Albrecht T and Thompson EA:** The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa immediate early protein. *J Biol Chem* 273: 22075-82, 1998.
599. **Caswell R, Bryant L and Sinclair J:** Human cytomegalovirus immediate-early 2 (IE2) protein can transactivate the human hsp70 promoter by alleviation of Dr1-mediated repression. *J Virol* 70: 4028-37, 1996.
600. **Hagemeier C, Walker SM, Sissons PJ and Sinclair JH:** The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements. *J Gen Virol* 73 (Pt 9): 2385-93, 1992.
601. **Jupp R, Hoffmann S, Stenberg RM, Nelson JA and Ghazal P:** Human cytomegalovirus IE86 protein interacts with promoter-bound TATA-binding protein via a specific region distinct from the autorepression domain. *J Virol* 67: 7539-46, 1993.
602. **Caswell R, Hagemeier C, Chiou CJ, Hayward G, Kouzarides T and Sinclair J:** The human cytomegalovirus 86K immediate early (IE) 2 protein requires the basic region of the TATA-box binding protein (TBP) for binding, and interacts with TBP and transcription factor TFIIB via regions of IE2 required for transcriptional regulation. *J Gen Virol* 74 (Pt 12): 2691-8, 1993.
603. **Lang D, Gebert S, Arlt H and Stamminger T:** Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB. *J Virol* 69: 6030-7, 1995.
604. **Cherrington JM, Houry EL and Mocarski ES:** Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site. *J Virol* 65: 887-96, 1991.

605. **Schwartz R, Sommer MH, Scully A and Spector DH:** Site-specific binding of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein to an early gene promoter. *J Virol* 68: 5613-22, 1994.
606. **Murphy JC, Fischle W, Verdin E and Sinclair JH:** Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J* 21: 1112-20, 2002.
607. **Nevels M, Paulus C and Shenk T:** Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17234-9, 2004.
608. **Park JJ, Kim YE, Pham HT, Kim ET, Chung YH and Ahn JH:** Functional interaction of the human cytomegalovirus IE2 protein with histone deacetylase 2 in infected human fibroblasts. *J Gen Virol* 88: 3214-23, 2007.
609. **Reeves M, Murphy J, Greaves R, Fairley J, Brehm A and Sinclair J:** Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86. *J Virol* 80: 9998-10009, 2006.
610. **Kieff E, Given D, Powell AL, King W, Dambaugh T and Raab-Traub N:** Epstein-Barr virus: structure of the viral DNA and analysis of viral RNA in infected cells. *Biochim Biophys Acta* 560: 355-73, 1979.
611. **Given D, Yee D, Griem K and Kieff E:** DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 30: 852-62, 1979.
612. **Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E and Rickinson A:** Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* 64: 4084-92, 1990.
613. **Yao QY, Rowe M, Martin B, Young LS and Rickinson AB:** The Epstein-Barr virus carrier state: dominance of a single growth-transforming isolate in the blood and in the oropharynx of healthy virus carriers. *J Gen Virol* 72 (Pt 7): 1579-90, 1991.
614. **Zimber U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz MV, Laux G, Desgranges C, Wittmann P, Freese UK, Schneider U and et al.:** Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 154: 56-66, 1986.
615. **Faulkner GC, Krajewski AS and Crawford DH:** The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* 8: 185-9, 2000.
616. **Henle G, Henle W and Diehl V:** Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59: 94-101, 1968.
617. **Maeda E, Akahane M, Kiryu S, Kato N, Yoshikawa T, Hayashi N, Aoki S, Minami M, Uozaki H, Fukayama M and Ohtomo K:** Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Jpn J Radiol* 27: 4-19, 2009.
618. **Ma SD, Hegde S, Young KH, Sullivan R, Rajesh D, Zhou Y, Jankowska-Gan E, Burlingham WJ, Sun X, Gulley ML, Tang W, Gumperz JE and Kenney SC:** A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J Virol* 85: 165-77, 2011.
619. **Toussiot E and Roudier J:** Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 883-96, 2008.
620. **Tselis A:** Epstein-Barr virus cause of multiple sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 24: 424-8, 2012.
621. **Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, Raab-Traub N, Walton LA and Pagano JS:** Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* 306: 480-3, 1983.
622. **Shannon-Lowe C, Adland E, Bell AI, Delecluse HJ, Rickinson AB and Rowe M:** Features distinguishing Epstein-Barr virus infections of epithelial cells and B cells: viral genome expression, genome maintenance, and genome amplification. *J Virol* 83: 7749-60, 2009.
623. **Speck P, Haan KM and Longnecker R:** Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology* 277: 1-5, 2000.
624. **Tugizov SM, Berline JW and Palefsky JM:** Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med* 9: 307-14, 2003.
625. **Xiao J, Palefsky JM, Herrera R, Berline J and Tugizov SM:** The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells. *Virology* 370: 430-42, 2008.
626. **Babcock GJ, Decker LL, Volk M and Thorley-Lawson DA:** EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9: 395-404, 1998.
627. **Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH and Thorley-Lawson DA:** A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* 80: 593-601, 1995.
628. **Laichalk LL and Thorley-Lawson DA:** Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* 79: 1296-307, 2005.
629. **Yates JL, Warren N and Sugden B:** Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313: 812-5, 1985.

630. **Yates J, Warren N, Reisman D and Sugden B**: A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3806-10, 1984.
631. **Woisetschlaeger M, Yandava CN, Furmanski LA, Strominger JL and Speck SH**: Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1725-9, 1990.
632. **Babcock GJ and Thorley-Lawson DA**: Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12250-5, 2000.
633. **Nonkwelo C, Skinner J, Bell A, Rickinson A and Sample J**: Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J Virol* 70: 623-7, 1996.
634. **Ambinder RF, Robertson KD and Tao Q**: DNA methylation and the Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol* 9: 369-75, 1999.
635. **Flemington EK, Goldfeld AE and Speck SH**: Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis. *J Virol* 65: 7073-7, 1991.
636. **Feederle R, Kost M, Baumann M, Janz A, Drouet E, Hammerschmidt W and Delecluse HJ**: The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J* 19: 3080-9, 2000.
637. **Tsurumi T, Fujita M and Kudoh A**: Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15: 3-15, 2005.
638. **Chevallier-Greco A, Manet E, Chavrier P, Mosnier C, Daillie J and Sergeant A**: Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J* 5: 3243-9, 1986.
639. **Takada K, Shimizu N, Sakuma S and Ono Y**: trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol* 57: 1016-22, 1986.
640. **Zalani S, Holley-Guthrie E and Kenney S**: Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9194-9, 1996.
641. **Ragoczy T, Heston L and Miller G**: The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J Virol* 72: 7978-84, 1998.
642. **Taylor N, Countryman J, Rooney C, Katz D and Miller G**: Expression of the BZLF1 latency-disrupting gene differs in standard and defective Epstein-Barr viruses. *J Virol* 63: 1721-8, 1989.
643. **Manet E, Gruffat H, Trescol-Biemont MC, Moreno N, Chambard P, Giot JF and Sergeant A**: Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *EMBO J* 8: 1819-26, 1989.
644. **Kalla M, Schmeinck A, Bergbauer M, Pich D and Hammerschmidt W**: AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 850-5, 2010.
645. **Ye J, Gradoville L and Miller G**: Cellular immediate-early gene expression occurs kinetically upstream of Epstein-Barr virus bzlfl1 and brlf1 following cross-linking of the B cell antigen receptor in the Akata Burkitt lymphoma cell line. *J Virol* 84: 12405-18, 2010.
646. **Jochum S, Ruiss R, Moosmann A, Hammerschmidt W and Zeidler R**: RNAs in Epstein-Barr virions control early steps of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E1396-404, 2012.
647. **Sun CC and Thorley-Lawson DA**: Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J Virol* 81: 13566-77, 2007.
648. **Chang PJ, Chang YS and Liu ST**: Role of Rta in the translation of bicistronic BZLF1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* 72: 5128-36, 1998.
649. **Packham G, Brimmell M, Cook D, Sinclair AJ and Farrell PJ**: Strain variation in Epstein-Barr virus immediate early genes. *Virology* 192: 541-50, 1993.
650. **Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG and Rickinson AB**: Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 185: 1605-17, 1997.
651. **Pepperl S, Benninger-Doring G, Modrow S, Wolf H and Jilg W**: Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 72: 8644-9, 1998.
652. **Kenney S, Kamine J, Holley-Guthrie E, Lin JC, Mar EC and Pagano J**: The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J Virol* 63: 1729-36, 1989.
653. **Flemington EK, Borrass AM, Lytle JP and Speck SH**: Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain. *J Virol* 66: 922-9, 1992.

654. **Heston L, El-Guindy A, Countryman J, Dela Cruz C, Delecluse HJ and Miller G:** Amino acids in the basic domain of Epstein-Barr virus ZEBRA protein play distinct roles in DNA binding, activation of early lytic gene expression, and promotion of viral DNA replication. *J Virol* 80: 9115-33, 2006.
655. **Kenney S, Holley-Guthrie E, Mar EC and Smith M:** The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J Virol* 63: 3878-83, 1989.
656. **Quinlivan EB, Holley-Guthrie EA, Norris M, Gutsch D, Bachenheimer SL and Kenney SC:** Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucleic Acids Res* 21: 1999-2007, 1993.
657. **Chang LK, Chung JY, Hong YR, Ichimura T, Nakao M and Liu ST:** Activation of Sp1-mediated transcription by Rta of Epstein-Barr virus via an interaction with MCAF1. *Nucleic Acids Res* 33: 6528-39, 2005.
658. **Hardwick JM, Tse L, Applegren N, Nicholas J and Veluona MA:** The Epstein-Barr virus R transactivator (Rta) contains a complex, potent activation domain with properties different from those of VP16. *J Virol* 66: 5500-8, 1992.
659. **Le Roux F, Sergeant A and Corbo L:** Epstein-Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in trans and competent for the activation of productive cycle genes does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome. *J Gen Virol* 77 (Pt 3): 501-9, 1996.
660. **Ragoczy T and Miller G:** Autostimulation of the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter is mediated through consensus Sp1 and Sp3 binding sites. *J Virol* 75: 5240-51, 2001.
661. **Adamson AL, Darr D, Holley-Guthrie E, Johnson RA, Mauser A, Swenson J and Kenney S:** Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J Virol* 74: 1224-33, 2000.
662. **Buisson M, Manet E, Trescol-Biemont MC, Gruffat H, Durand B and Sergeant A:** The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *J Virol* 63: 5276-84, 1989.
663. **Lieberman PM, Hardwick JM, Sample J, Hayward GS and Hayward SD:** The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J Virol* 64: 1143-55, 1990.
664. **Lieberman PM and Berk AJ:** In vitro transcriptional activation, dimerization, and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein. *J Virol* 64: 2560-8, 1990.
665. **El-Guindy AS and Miller G:** Phosphorylation of Epstein-Barr virus ZEBRA protein at its casein kinase 2 sites mediates its ability to repress activation of a viral lytic cycle late gene by Rta. *J Virol* 78: 7634-44, 2004.
666. **Bhende PM, Seaman WT, Delecluse HJ and Kenney SC:** BZLF1 activation of the methylated form of the BRLF1 immediate-early promoter is regulated by BZLF1 residue 186. *J Virol* 79: 7338-48, 2005.
667. **Kalla M, Gobel C and Hammerschmidt W:** The lytic phase of Epstein-Barr virus requires a viral genome with 5-methylcytosine residues in CpG sites. *J Virol* 86: 447-58, 2012.
668. **Dickerson SJ, Xing Y, Robinson AR, Seaman WT, Gruffat H and Kenney SC:** Methylation-dependent binding of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein to viral promoters. *PLoS Pathog* 5: e1000356, 2009.
669. **Bergbauer M, Kalla M, Schmeinck A, Gobel C, Rothbauer U, Eck S, Benet-Pages A, Strom TM and Hammerschmidt W:** CpG-methylation regulates a class of Epstein-Barr virus promoters. *PLoS Pathog* 6: e1001114, 2010.
670. **Karlsson QH, Schelcher C, Verrall E, Petosa C and Sinclair AJ:** Methylated DNA recognition during the reversal of epigenetic silencing is regulated by cysteine and serine residues in the Epstein-Barr virus lytic switch protein. *PLoS Pathog* 4: e1000005, 2008.
671. **Wille CK, Nawandar DM, Panfil AR, Ko MM, Hagemeyer SR and Kenney SC:** Viral genome methylation differentially affects the ability of BZLF1 versus BRLF1 to activate Epstein-Barr virus lytic gene expression and viral replication. *J Virol* 87: 935-50, 2013.
672. **Ramasubramanyan S, Osborn K, Flower K and Sinclair AJ:** Dynamic chromatin environment of key lytic cycle regulatory regions of the Epstein-Barr virus genome. *J Virol* 86: 1809-19, 2012.
673. **Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Kanda T and Tsurumi T:** Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells. *J Virol* 86: 4752-61, 2012.

674. **Fixman ED, Hayward GS and Hayward SD:** Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol* 69: 2998-3006, 1995.
675. **Zhang Q, Hong Y, Dorsky D, Holley-Guthrie E, Zalani S, Elshiekh NA, Kiehl A, Le T and Kenney S:** Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic replication. *J Virol* 70: 5131-42, 1996.
676. **Miller G, El-Guindy A, Countryman J, Ye J and Gradoville L:** Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Adv Cancer Res* 97: 81-109, 2007.
677. **Rennekamp AJ, Wang P and Lieberman PM:** Evidence for DNA hairpin recognition by Zta at the Epstein-Barr virus origin of lytic replication. *J Virol* 84: 7073-82, 2010.
678. **Chang YN, Dong DL, Hayward GS and Hayward SD:** The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol* 64: 3358-69, 1990.
679. **Flemington E and Speck SH:** Evidence for coiled-coil dimer formation by an Epstein-Barr virus transactivator that lacks a heptad repeat of leucine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9459-63, 1990.
680. **Schelcher C, Al Mehairi S, Verrall E, Hope Q, Flower K, Bromley B, Woolfson DN, West MJ and Sinclair AJ:** Atypical bZIP domain of viral transcription factor contributes to stability of dimer formation and transcriptional function. *J Virol* 81: 7149-55, 2007.
681. **Lieberman PM and Berk AJ:** The Zta trans-activator protein stabilizes TFIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction. *Genes Dev* 5: 2441-54, 1991.
682. **Lieberman PM and Berk AJ:** A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA--promoter DNA complex formation. *Genes Dev* 8: 995-1006, 1994.
683. **Zhang Q, Gutsch D and Kenney S:** Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 14: 1929-38, 1994.
684. **Gutsch DE, Holley-Guthrie EA, Zhang Q, Stein B, Blonar MA, Baldwin AS and Kenney SC:** The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 14: 1939-48, 1994.
685. **Sista ND, Barry C, Sampson K and Pagano J:** Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 23: 1729-36, 1995.
686. **Chang SS, Lo YC, Chua HH, Chiu HY, Tsai SC, Chen JY, Lo KW and Tsai CH:** Critical role of p53 in histone deacetylase inhibitor-induced Epstein-Barr virus Zta expression. *J Virol* 82: 7745-51, 2008.
687. **Chua HH, Chiu HY, Lin SJ, Weng PL, Lin JH, Wu SW, Tsai SC and Tsai CH:** p53 and Sp1 cooperate to regulate the expression of Epstein-Barr viral Zta protein. *J Med Virol* 84: 1279-88, 2012.
688. **Dreyfus DH, Liu Y, Ghoda LY and Chang JT:** Analysis of an ankyrin-like region in Epstein Barr Virus encoded (EBV) BZLF-1 (ZEBRA) protein: implications for interactions with NF-kappaB and p53. *Virol J* 8: 422, 2011.
689. **Fais F, Cutrona G, Ulivi M, Roncella S, Gagliardi MC, Cornaglia-Ferraris P, Rowe M, Barnaba V and Ferrarini M:** Lymphoblastoid cells transfected with c-myc: downregulation of EBV-lytic antigens and impaired response of autologous CD4+ T cells in vitro. *Int J Cancer* 68: 810-6, 1996.
690. **Rodriguez A, Jung EJ, Yin Q, Cayrol C and Flemington EK:** Role of c-myc regulation in Zta-mediated induction of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 and cell growth arrest. *Virology* 284: 159-69, 2001.
691. **Lin Z, Yin Q and Flemington E:** Identification of a negative regulatory element in the Epstein-Barr virus Zta transactivation domain that is regulated by the cell cycle control factors c-Myc and E2F1. *J Virol* 78: 11962-71, 2004.
692. **Robinson AR, Kwek SS, Hagemeyer SR, Wille CK and Kenney SC:** Cellular transcription factor Oct-1 interacts with the Epstein-Barr virus BRLF1 protein to promote disruption of viral latency. *J Virol* 85: 8940-53, 2011.
693. **Yang YC and Chang LK:** Role of TAF4 in Transcriptional Activation by Rta of Epstein-Barr Virus. *PLoS One* 8: e54075, 2013.
694. **Zerby D, Chen CJ, Poon E, Lee D, Shiekhhattar R and Lieberman PM:** The amino-terminal C/H1 domain of CREB binding protein mediates zta transcriptional activation of latent Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol* 19: 1617-26, 1999.
695. **Adamson AL and Kenney S:** The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein. *J Virol* 73: 6551-8, 1999.

696. **Chen CJ, Deng Z, Kim AY, Blobel GA and Lieberman PM:** Stimulation of CREB binding protein nucleosomal histone acetyltransferase activity by a class of transcriptional activators. *Mol Cell Biol* 21: 476-87, 2001.
697. **Swenson JJ, Holley-Guthrie E and Kenney SC:** Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 interacts with CBP, promoting enhanced BRLF1 transactivation. *J Virol* 75: 6228-34, 2001.
698. **Chang LK and Liu ST:** Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. *Nucleic Acids Res* 28: 3918-25, 2000.
699. **Countryman JK, Gradoville L and Miller G:** Histone hyperacetylation occurs on promoters of lytic cycle regulatory genes in Epstein-Barr virus-infected cell lines which are refractory to disruption of latency by histone deacetylase inhibitors. *J Virol* 82: 4706-19, 2008.
700. **Gruffat H, Manet E and Sergeant A:** MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep* 3: 141-6, 2002.
701. **Bryant H and Farrell PJ:** Signal Transduction and Transcription Factor Modification during Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J Virol* 76: 10290-8, 2002.
702. **Tsai PF, Lin SJ, Weng PL, Tsai SC, Lin JH, Chou YC and Tsai CH:** Interplay between PKCdelta and Sp1 on histone deacetylase inhibitor-mediated Epstein-Barr virus reactivation. *J Virol* 85: 2373-85, 2011.
703. **Cayrol C and Flemington EK:** The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO J* 15: 2748-59, 1996.
704. **Wu FY, Chen H, Wang SE, ApRhys CM, Liao G, Fujimuro M, Farrell CJ, Huang J, Hayward SD and Hayward GS:** CCAAT/enhancer binding protein alpha interacts with ZTA and mediates ZTA-induced p21(CIP-1) accumulation and G(1) cell cycle arrest during the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol* 77: 1481-500, 2003.
705. **Wu FY, Wang SE, Chen H, Wang L, Hayward SD and Hayward GS:** CCAAT/enhancer binding protein alpha binds to the Epstein-Barr virus (EBV) ZTA protein through oligomeric interactions and contributes to cooperative transcriptional activation of the ZTA promoter through direct binding to the ZII and ZIIIB motifs during induction of the EBV lytic cycle. *J Virol* 78: 4847-65, 2004.
706. **Zacny VL, Wilson J and Pagano JS:** The Epstein-Barr virus immediate-early gene product, BRLF1, interacts with the retinoblastoma protein during the viral lytic cycle. *J Virol* 72: 8043-51, 1998.
707. **Guo Q, Qian L, Guo L, Shi M, Chen C, Lv X, Yu M, Hu M, Jiang G and Guo N:** Transactivators Zta and Rta of Epstein-Barr virus promote G0/G1 to S transition in Raji cells: a novel relationship between lytic virus and cell cycle. *Mol Immunol* 47: 1783-92, 2010.
708. **Daibata M, Humphreys RE and Sairenji T:** Phosphorylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA. *Virology* 188: 916-20, 1992.
709. **Francis AL, Gradoville L and Miller G:** Alteration of a single serine in the basic domain of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein separates its functions of transcriptional activation and disruption of latency. *J Virol* 71: 3054-61, 1997.
710. **Baumann M, Mischak H, Dammeier S, Kolch W, Gires O, Pich D, Zeidler R, Delecluse HJ and Hammerschmidt W:** Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *J Virol* 72: 8105-14, 1998.
711. **Gradoville L, Kwa D, El-Guindy A and Miller G:** Protein kinase C-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol* 76: 5612-26, 2002.
712. **Tardif M, Savard M, Flamand L and Gosselin J:** Impaired protein kinase C activation/translocation in Epstein-Barr virus-infected monocytes. *J Biol Chem* 277: 24148-54, 2002.
713. **Cayrol C and Flemington EK:** Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 2. *J Virol* 69: 4206-12, 1995.
714. **Mahot S, Sergeant A, Drouet E and Gruffat H:** A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. *J Gen Virol* 84: 965-74, 2003.
715. **Fahmi H, Cochet C, Hmama Z, Opolon P and Joab I:** Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol* 74: 5810-8, 2000.
716. **Liang CL, Chen JL, Hsu YP, Ou JT and Chang YS:** Epstein-Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos proteins. *J Biol Chem* 277: 23345-57, 2002.
717. **Morrison TE, Mauser A, Wong A, Ting JP and Kenney SC:** Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity* 15: 787-99, 2001.

718. **Morrison TE, Mauser A, Klingelutz A and Kenney SC:** Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1. *J Virol* 78: 544-9, 2004.
719. **Hahn AM, Huye LE, Ning S, Webster-Cyriaque J and Pagano JS:** Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr virus immediate-early gene, BZLF-1. *J Virol* 79: 10040-52, 2005.
720. **Li D, Qian L, Chen C, Shi M, Yu M, Hu M, Song L, Shen B and Guo N:** Down-regulation of MHC class II expression through inhibition of CIITA transcription by lytic transactivator Zta during Epstein-Barr virus reactivation. *J Immunol* 182: 1799-809, 2009.
721. **Bentz GL, Liu R, Hahn AM, Shackelford J and Pagano JS:** Epstein-Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon-beta. *Virology* 402: 121-8, 2010.
722. **Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Liu R, Lago A, Hofmann G, Macarron R, de los Frailes M, Perez P, Krawiec J, Winkler J and Jaye M:** Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 720-8, 2003.
723. **Baumli S, Hole AJ, Noble ME and Endicott JA:** The CDK9 C-helix exhibits conformational plasticity that may explain the selectivity of CAN508. *ACS Chem Biol* 7: 811-6, 2012.
724. **Fujinaga K, Barboric M, Li Q, Luo Z, Price DH and Peterlin BM:** PKC phosphorylates HEXIM1 and regulates P-TEFb activity. *Nucleic Acids Res* 40: 9160-70, 2012.
725. **Klan N, Seuter S, Schnur N, Jung M and Steinhilber D:** Trichostatin A and structurally related histone deacetylase inhibitors induce 5-lipoxygenase promoter activity. *Biol Chem* 384: 777-85, 2003.
726. **Stoffers KL, Sorg BL, Seuter S, Rau O, Radmark O and Steinhilber D:** Calcitriol upregulates open chromatin and elongation markers at functional vitamin D response elements in the distal part of the 5-lipoxygenase gene. *J Mol Biol* 395: 884-96, 2010.
727. **Qiu H, Straat K, Rahbar A, Wan M, Soderberg-Naucler C and Haeggstrom JZ:** Human CMV infection induces 5-lipoxygenase expression and leukotriene B4 production in vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 205: 19-24, 2008.
728. **Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL and Kolchanov NA:** Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26: 362-7, 1998.
729. **Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N and Peterlin BM:** NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 8: 327-37, 2001.
730. **Garrett S, Barton WA, Knights R, Jin P, Morgan DO and Fisher RP:** Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop. *Mol Cell Biol* 21: 88-99, 2001.
731. **Gang D, Hongwei H, Hedai L, Ming Z, Qian H and Zhijun L:** The tumor suppressor protein menin inhibits NF-kappaB-mediated transactivation through recruitment of Sirt1 in hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*: 2012.
732. **Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD and Hess JL:** MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10: 1107-17, 2002.
733. **Huang B, Yang XD, Zhou MM, Ozato K and Chen LF:** Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol Cell Biol* 29: 1375-87, 2009.
734. **Schulze-Gahmen U, Upton H, Birnberg A, Bao K, Chou S, Krogan NJ, Zhou Q and Alber T:** The AFF4 scaffold binds human P-TEFb adjacent to HIV Tat. *Elife* 2: e00327, 2013.
735. **Chou S, Upton H, Bao K, Schulze-Gahmen U, Samelson AJ, He N, Nowak A, Lu H, Krogan NJ, Zhou Q and Alber T:** HIV-1 Tat recruits transcription elongation factors dispersed along a flexible AFF4 scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E123-31, 2013.
736. **Bieliauskas AV and Pflum MK:** Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chem Soc Rev* 37: 1402-13, 2008.
737. **Xie K, Lambie EJ and Snyder M:** Nuclear dot antigens may specify transcriptional domains in the nucleus. *Mol Cell Biol* 13: 6170-9, 1993.
738. **Handwerker KE and Gall JG:** Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* 16: 19-26, 2006.
739. **Mao YS, Zhang B and Spector DL:** Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet* 27: 295-306, 2011.
740. **Spector DL and Lamond AI:** Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 2011.
741. **Matera AG and Ward DC:** Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J Cell Biol* 121: 715-27, 1993.

742. **Pessler F, Pendergrast PS and Hernandez N:** Purification and characterization of FBI-1, a cellular factor that binds to the human immunodeficiency virus type 1 inducer of short transcripts. *Mol Cell Biol* 17: 3786-98, 1997.
743. **Pendergrast PS, Wang C, Hernandez N and Huang S:** FBI-1 can stimulate HIV-1 Tat activity and is targeted to a novel subnuclear domain that includes the Tat-P-TEFb-containing nuclear speckles. *Mol Biol Cell* 13: 915-29, 2002.
744. **Cmarko D, Verschure PJ, Martin TE, Dahmus ME, Krause S, Fu XD, van Driel R and Fakan S:** Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol Biol Cell* 10: 211-23, 1999.
745. **Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ and Cook PR:** Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* 12: 1059-65, 1993.
746. **Cook PR:** Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nat Genet* 32: 347-52, 2002.
747. **Faro-Trindade I and Cook PR:** A conserved organization of transcription during embryonic stem cell differentiation and in cells with high C value. *Mol Biol Cell* 17: 2910-20, 2006.
748. **Pombo A, Jackson DA, Hollinshead M, Wang Z, Roeder RG and Cook PR:** Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *EMBO J* 18: 2241-53, 1999.
749. **Cook PR:** A model for all genomes: the role of transcription factories. *J Mol Biol* 395: 1-10, 2010.
750. **Soderberg-Naucler C, Fish KN and Nelson JA:** Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91: 119-26, 1997.
751. **Rakonjac M, Fischer L, Provost P, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B and Radmark O:** Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13150-5, 2006.
752. **Gosselin J, Borgeat P and Flamand L:** Leukotriene B4 protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation. *J Immunol* 174: 1587-93, 2005.
753. **Flamand L, Borgeat P, Lalonde R and Gosselin J:** Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans. *J Infect Dis* 189: 2001-9, 2004.
754. **Radmark O, Werz O, Steinhilber D and Samuelsson B:** 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* 32: 332-41, 2007.
755. **Flory E, Hoffmeyer A, Smola U, Rapp UR and Bruder JT:** Raf-1 kinase targets GA-binding protein in transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* 70: 2260-8, 1996.
756. **Goodwin EC and Rottman FM:** The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem* 267: 16330-4, 1992.
757. **Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H and Hillen W:** Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7963-8, 2000.
758. **Subach OM, Gundorov IS, Yoshimura M, Subach FV, Zhang J, Gruenwald D, Souslova EA, Chudakov DM and Verkhusha VV:** Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Chem Biol* 15: 1116-24, 2008.
759. **Xia NS, Luo WX, Zhang J, Xie XY, Yang HJ, Li SW, Chen M and Ng MH:** Bioluminescence of *Aequorea macrodactyla*, a common jellyfish species in the East China Sea. *Mar Biotechnol (NY)* 4: 155-62, 2002.
760. **Mates L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, VandenDriessche T, Ivics Z and Izsvak Z:** Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* 41: 753-61, 2009.
761. **Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L and Trono D:** Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15: 871-5, 1997.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Massenprozent
°C	Grad Celsius
A/mA	Ampere/Milliampere
ad	<i>add up to</i> (auffüllen auf)
AF4	<i>ALL-1 fused gene on chromosome 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i> ("Unterscheidungsgruppen")
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
der11/der4	Derivatchromosom 11 bzw. 4
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Kälberserumalbumin
BFP/GFP/RFP	<i>Blue/Green/Red Fluorescent Protein</i> (Blau/Grün/Rot-fluoreszierendes Protein)
g/kg/µg/ng	Gramm/Kilogramm/Mikrogramm/Nanogramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GOI	<i>gene of interest</i>

h	<i>hour</i>
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus-1</i> (humanes Immundefizienz-Virus)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
kb	Kilobasen
kd	<i>knock-down</i>
l/ml/ μ l	Liter/Milliliter/Mikroliter
M/mM/ μ M	Mol/Millimol/Mikromol
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Multiple Klonierstelle)
min	Minute
mol	Mol
MPC	Multi-Protein-Komplex
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit)
UV	Ultraviolettstrahlung
V/kV	Volt/Kilovolt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7.2. Lebenslauf

BASTIAN SCHOLZ

Geburtsdatum/Ort: 09.05.1985 in Hanau **Staatsangehörigkeit:** deutsch

Familienstand: Ledig

seit 06/2010 **Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main**

Promotion am Fachbereich 14 "Biochemie, Chemie und Pharmazie" in Pharmazeutischer Biologie. Thema der Promotion: "*Die Rolle des AF4 Protein in der Transkription und in der Infektion durch Herpesviren*". Angestellt als Wissenschaftlicher Mitarbeiter, *Acute Leukemia Research Group*, Arbeitsgruppe Dingermann/Marschalek. Forschungsfokus auf Leukämie-assoziierte Multiproteinkomplexe und deren Einfluss auf Transkription, Epigenetische Programmierung und Signaltransduktionswege (siehe Publikationen). Diese Position umfasste Laboraufsicht und Lehre in Pharmazeutischer Biologie.

08/2009 – 06/2010 **Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main**

Technischer Assistent/Doktorand in der oben genannten Gruppe.

11/2008 – 08/2009 **Fachbereich für Familie und Kultur, Gemeinde Schöneck, Hessen**

Ableistung des obligatorischen Zivildiensts; Nicht-wissenschaftliche Tätigkeit.

10/2004 – 01/2009 **Hochschule Darmstadt, University of Applied Science, Darmstadt**

Studium im Studiengang "Biotechnologie".

Erwerb des Titels "Diplom-Ingenieur für Biotechnologie (FH)", Kumulative Note 1.0.

Schwerpunkte und Diplomprüfungen in Biochemie (Note 1,0), Molekularbiologie/Genetik (Note 1,0) und Bioverfahrenstechnik (Note 1,0). Die Diplomarbeit „*Etablierung und Durchführung von Zytotoxizitätsstudien in humanen pharyngealen Zelllinien*“ (Note 1,0) wurde in der Abteilung *Research and Development, TD Cardiovascular* der Firma Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main, durchgeführt.

06/1995 – 06/2004 **Gesamtschule Kopernikusschule, Freigericht, Hessen**

Schulbesuch der weiterführenden Schule mit gymnasialer Oberstufe. Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife mit der Kumulativen Note 1,8. Abschlussprüfungen in Biologie, Politik/Wirtschaft, Englisch und Religion.

06/1991-06/1995 **Grundschule I, Erlensee, Hessen**

AKADEMISCHE LEHRER

Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer, Prof. Dr. Regina Heinzl-Wieland, Prof. Dr. Hans-Jürgen Koepp-Bank, Prof. Dr. Rolf Marschalek und Prof. Dr. Theodor Dingermann.

7.3. Publikationen und Vorträge

PUBLIKATIONEN

Benedikt A, Baltruschat S, Scholz B, Bursen A, Arrey TN, Meyer B, Varagnolo L, Müller A, Karas M, Dingermann T, Marschalek R. **The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures.** Leukemia. 2011 Jan; 25(1): 135-44

Scholz B, Marschalek R. **Epigenetics and blood disorders.** Br J Haematol. 2012 Aug; 158(3): 307-22

Emerenciano M, Kowarz E, Karl K, de Almeida Lopes B, Scholz B, Bracharz S, Meyer C, Pombo-de-Oliveira MS, Marschalek R. **Functional analysis of the two reciprocal fusion genes MLL-NEBL and NEBL-MLL reveal their oncogenic potential.** Cancer Lett. 2013 May; 332(1): 30-4

Buscató E, Büttner D, Brüggerhoff A, Klingler FM, Weber J, Scholz B, Zivkovic A, Marschalek R, Stark, H, Steinhilber D, Bode H, Proschak E. **From a Multipotent Stilbene to Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors with Antiproliferative Properties.** ChemMedChem, eingereicht und akzeptiert.

VORTRAGE

“Purification of the AF4 and AF4-MLL protein complexes revealed a central role of activated P-TEFb kinase and epigenetic dysregulation in t(4;11) leukemia”, 2nd UCT Science Day, Klinikum Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main, 08.09.2010

"The AF4/AF4•MLL interactome", 24. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede/Niedersachsen, 17.06.2011

"Structural and functional analysis of the AF4 and AF4•MLL multi-protein-complexes", Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro/Brasilien, 15.03.2012

7.4. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Überlassung des sehr interessanten Themas, seine kompetente und freundschaftliche Betreuung, das Vertrauen in die Eigenständigkeit dieser Arbeit, deren Durchsicht und ganz besonders für die Gewährung vieler forschungsbezogener und anderer Freiheiten.

Prof. Dr. Theodor Dingermann für die kritischen und sehr produktiven Diskussionen während der Arbeitsseminare sowie für die reibungslose Zusammenarbeit in den Praktika sowie die Überlassung der Seminare.

Prof. Dr. Dieter Steinhilber für die interessante und langanhaltende Kooperation, für die Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit und ganz besonders für das entgegengebrachte Vertrauen als man zweimal hinschauen musste.

Dr. Claus Meyer für die unermüdliche Organisation des DAAD-Austauschprogramms mit Brasilien, für die hervorragende Zeit in Rio de Janeiro sowie für seinen stets sehr unterstützenden und freundschaftlichen Rat und Umgang.

Dr. Eric Kowarz für die allzeit kompetente Beratung und die Bereitstellung unzähliger Vektoren und Klonierungspläne sowie seines unschätzbaren Fundus an Tricks, wenn die DNA nicht so möchte wie der Doktorand.

Dr. Adelheid Bursen für die stetige Diskussionsbereitschaft, die kritische Bewertung in den Arbeitsseminaren und für das stets offene Ohr für jede Art von Frage.

Jenny Merkens danke ich sehr herzlich für die sehr angenehme Zeit in und außerhalb des Labors, für viele amüsante Kaffeepausen, unzählige Teemischungen in Bio II und viele andere Sachen, die alle aufzuzählen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

Carola Prella für die tolle Labornachbarschaft, das Mitleiden über die Jahre, die Durchsicht dieser Arbeit und die Beantwortung von unzähligen mehr oder weniger sinnvollen Fragen.

Khalil Ahmad für die stets angenehme und produktive Zusammenarbeit, für sein Engagement alte Sachen aufzuarbeiten und für unzählige Reportergerätenversuchen.

Weiterhin danke ich herzlich dem ganzen Institut für Pharmazeutische Biologie, namentlich Dr. Ilse Zündorf, Sigrid Schickling-Herzog, Silvia Bracharz, Freya Pfeil, Christian Engelbrecht, Katharina Karl, Fabian Mück, Tanja Rößler, den Ehemaligen Dr. Jenny Hsieh, Dr. Birgit Pless, Dr. Nadine Spilger, Dr. Samaneh Sabiani, und ganz besonders Julia Haas und Katharina Ruhland sowie Dr. Anne Benedikt für die tolle Zusammenarbeit in den letzten Jahren und viele angenehme Stunden.

7. Anhang

Hiermit erkläre ich, Bastian Scholz, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 23.07.2013

Bastian Scholz