

**Funktionelle Charakterisierung
der CK2-vermittelten Phosphorylierung des
Transkriptionsfaktors TIF-IA
bei der Regulation der Synthese ribosomaler RNA**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Holger Bierhoff
aus Meschede im Sauerland

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Funktionelle Charakterisierung
der CK2-vermittelten Phosphorylierung des
Transkriptionsfaktors TIF-IA
bei der Regulation der Synthese ribosomaler RNA**

Gutachter:

Prof. Dr. Ingrid Grummt

Prof. Dr. Gabriele Petersen

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Heidelberg, den

Holger Bierhoff

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Ingrid Grummt für die Betreuung und wissenschaftliche Leitung meiner Arbeit. Besonders bei den wöchentlichen „Kaffee-Stunden“ gab es immer viele Anregungen und gute Ideen, aber auch ein offenes Ohr für die Probleme im Laboralltag (“Hausnummern-Experimente”) und Ansporn für die experimentelle Arbeit (“Klonieren tut man nebenbei”, “Über ein Western Blöttchen spricht man nicht”, “Ein Transkriptionen bringt einen nicht um”). Auch zum schriftlichen Gelingen meiner Arbeit hat sie durch kritisches Lesen, gute Vorschläge sowie Motivationsansätze (“Nulla dies sine linea”) wesentlich beigetragen.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitgliedern des Grummt-Labors für (zum Glück nicht immer nur) wissenschaftliche Diskussionen sowie für zahlreiche Tips zum Experimentier-Handwerk und für meine Arbeit. Ein Dankeschön auch an Anne und Herrn Hartung für die vielen kleinen Hilfestellungen, die mir den Laboralltag oft um einiges leichter gemacht haben.

Ein besonderes Dankeschön geht natürlich an meine „spezielle“ Kollegin Kerstin, mit der ich nicht nur die Liebe zur Wissenschaft teile. Danke, daß Du dein Herz in Heidelberg verloren hast und mit mir diesen Weg gegangen bist.

Auch meinen Eltern und Geschwistern gilt ein großes Dankeschön für die vielfältige Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

I	Inhaltsverzeichnis	I-IV
1	Zusammenfassung / Summary	1
2	Einleitung	3
2.1	Synthese ribosomaler RNA	3
2.2	Struktur der rRNA Gene	3
2.3	Der initiationskompetente Pol I Transkriptionsapparat	5
2.4	Der Pol I Transkriptionszyklus	8
2.5	Regulation der Pol I Transkription durch Phosphorylierung von TIF-IA	11
2.6	Die Proteinkinase CK2	13
2.7	CK2-abhängige Regulation der Transkription	14
2.8	Problemstellung	16
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
3.1.2	Oligonukleotide	19
3.1.3	Plasmide	20
3.1.4	Antikörper	21
3.1.5	Standard-Lösungen	21

3.2 Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden	22
3.2.2 Gezielte PCR-Mutagenese	22
3.3 Zellbiologische Methoden	23
3.3.1 Kultivierung von Zellen	23
3.3.2 Transiente Transfektion	23
3.3.3 Retrovirale Infektion von Maus-Fibroblasten	23
3.4 Proteinbiochemische Methoden	24
3.4.1 Herstellung von Zellkern-Extrakten für <i>in vitro</i> Transkription	24
3.4.2 Herstellung von Zell-Lysaten	24
3.4.3 Immunpräzipitation	24
3.4.4 Immunfluoreszenz	25
3.4.5 Western Blot	25
3.4.6 Proteinfärbung mit Silber	26
3.4.7 Herstellung und Reinigung von Phospho-spezifischen Antikörpern	26
3.5 Präparation und Analyse von zellulärer RNA	27
3.5.1 Präparation von RNA	27
3.5.2 Reverse Transkription	27
3.5.3 Northern Blot Analyse von 45S rRNA und Reporter-Transkripten	27
3.5.4 Herstellung von ³² P-UTP markierten RNA-Sonden	28
3.6 Bestimmung der Luciferase-Aktivität	29
3.7 <i>in vitro</i> Transkription	29
3.7.1 <i>in vitro</i> Transkription im Standard-System	29
3.7.2 abortive Transkriptionsanalyse	30

3.8	Analyse der Phosphorylierung von TIF-IA	30
3.8.1	<i>in vitro</i> Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2	30
3.8.2	Phospho-Peptid-Analysen	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Untersuchungen zur Funktion der proximalen Promotor-Domäne bei der Initiation der Pol I Transkription	32
4.1.1	Die Pol I Transkription wird durch Mutation an Position -7 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> inhibiert	32
4.1.2	Die Bindung eines transient mit dem Promotor assoziierten Faktors wird durch die G-7 Mutation beeinträchtigt	34
4.1.3	Die transkriptionelle Aktivität der G-7 Promotor-Mutante ist von TIF-IA abhängig	36
4.1.4	Die Re-Initiation der Pol I Transkription wird durch die G-7 Mutation nicht beeinträchtigt	37
4.1.5	Die G-7 Promotor-Mutante ist in einem frühen Schritt der Initiation beeinträchtigt	39
4.2	Regulation der Pol I Transkription durch CK2-abhängige Phosphorylierung von TIF-IA	40
4.2.1	CK2 ist für die 45S rRNA Synthese essentiell	40
4.2.2	TIF-IA wird durch Inhibition von CK2 inaktiviert	41
4.2.3	Serin 170 und 172 in TIF-IA werden durch CK2 phosphoryliert	43
4.2.4	Die Mutation von Serin 170 und 172 inhibiert die transkriptionelle Aktivität von TIF-IA	47
4.2.5	Die CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA ist für die Zellproliferation und Struktur des Nukleolus essentiell	50
4.2.6	Inhibierung der Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2 verstärkt die Assoziation von TIF-IA mit Pol I	59
4.2.7	CK2 inhibiert die Ausbildung initiationskompetenter TIF-IA-Pol I Komplexe	62

5	Diskussion	66
5.1	Das Guanin an Position -7 des rDNA-Promotors ist an der Ausbildung funktioneller Prä-Initiationskomplexe beteiligt	66
5.2	Die rDNA-Transkription wird durch CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA nach Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes gesteuert	69
6	Literaturverzeichnis	76
7	Publikationen	88

1 Zusammenfassung

In Säugern wird die ribosomale RNA von RNA-Polymerase I (Pol I) synthetisiert. Die Interaktion der Pol I-spezifischen Faktoren TIF-IA und TIF-IB miteinander sowie die Bindung von TIF-IB an den rDNA-Promotor sind für die Transkriptionsinitiation notwendig. Ein Guanin an Position -7 (G-7) im *core promoter element* des rDNA-Promotors ist nicht für die Bindung von TIF-IB, jedoch für eine effiziente rRNA Synthese notwendig. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, führt eine G-7→A Transition *in vitro* und *in vivo* zu einer starken Inhibierung der Promotoraktivität. Transkriptionsanalysen mit immobilisierten rDNA-Matrizen sowie abortive Transkriptionsexperimente wiesen auf eine Hemmung der Assoziation von TIF-IA mit dem rDNA-Promotor durch die G-7 Mutation hin. Jedoch haben Transkriptionsanalysen unter *single round*-Bedingungen und nach Depletierung von TIF-IA gezeigt, daß TIF-IA für die Transkription an der mutierten Matrize erforderlich ist. Somit scheint ein bislang unbekanntes Protein an der Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes beteiligt zu sein, das an G-7 bindet.

TIF-IA ist ein Phospho-Protein, das an mehreren Serinresten, unter anderem auch an Serin 170 und 172, phosphoryliert wird. Ziel dieser Arbeit war es, die Phosphorylierung dieser Serinreste funktionell aufzuklären und die entsprechende Kinase zu identifizieren. Durch Herstellung einer nicht-phosphorylierbaren Mutante (TIF-IAS170A/S172A) konnte gezeigt werden, daß die Serine 170 und 172 durch Casein-Kinase 2 (CK2) *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert werden. Die Analyse der transkriptionellen Aktivität sowie die Expression von TIF-IAS170A/S172A in *TIF-IA knockout* Zellen ergaben, daß TIF-IA ohne die CK2-vermittelte Phosphorylierung nicht funktionell ist. In Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurde nachgewiesen, daß die Inhibierung der Phosphorylierung von Serin 170 und 172 eine verstärkte Bindung von TIF-IA an Pol I bewirkt, während die Interaktion mit TIF-IB nicht beeinflußt wird. Mit Hilfe eines Antiserums, das spezifisch Phospho-Serin 170 und 172 in TIF-IA erkennt, wurde gezeigt, daß die CK2-vermittelte Phosphorylierung die Bindung von TIF-IA an Pol I verhindert. Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, daß TIF-IA nach der Transkriptionsinitiation von CK2 phosphoryliert wird und daß diese Phosphorylierung die Dissoziation von TIF-IA vom Elongationskomplex induziert. Diese CK2-vermittelte, reversible Phosphorylierung von TIF-IA ist somit für die produktive Elongation bzw. eine effiziente Re-Initiation essentiell.

1 Summary

In mammals, the synthesis of ribosomal RNA is carried out by RNA polymerase I (Pol I). The interaction between the Pol I-specific factors TIF-IA and TIF-IB as well as the binding of the promoter selectivity factor TIF-IB to the rDNA promoter facilitate initiation of transcription. A guanine at position -7 (G-7) is not required for binding of TIF-IB to rDNA, but is needed for efficient rRNA synthesis. As shown in this study, a G-7→A transition strongly inhibits promoter activity both *in vitro* and *in vivo*. Abortive transcription assays and transcription experiments with immobilised rDNA templates suggested that binding of TIF-IA to the rDNA promoter is impaired due to the G-7 mutation. However, transcription assays under single round conditions and after depletion of TIF-IA revealed that transcription of the mutated template depends on TIF-IA. Therefore, a so far unidentified protein that binds to G-7 seems to take part in the formation of the pre-initiation complex.

TIF-IA is phosphorylated at multiple sites, including two serine residues at position 170 and 172. The goal of this study was to elucidate the function of serine 170 and 172 phosphorylation in rDNA transcription and to identify the respective kinase. By establishing a phospho-ablation mutant (TIF-IAS170A/S172A) it was shown that both serine residues are phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by casein kinase 2 (CK2). Analysis of transcriptional activity as well as expression of TIF-IAS170A/S172A in *TIF-IA* knockout cells demonstrated that TIF-IA is not functional if serine residues 170 and 172 can not be phosphorylated. Furthermore, co-immunoprecipitation experiments revealed increased binding of TIF-IA to Pol I after inhibition of CK2-dependent phosphorylation, whereas the interaction with TIF-IB was not affected. An antiserum was generated which specifically recognises phospho-serine residues 170 and 172 in TIF-IA and used to show that CK2-mediated phosphorylation prevents binding of TIF-IA to Pol I. This data suggest a model in which TIF-IA is phosphorylated by CK2 after transcription initiation to induce the dissociation of TIF-IA from the elongating Pol I complex. Thereby the CK2-dependent, reversible phosphorylation of TIF-IA might facilitate productive elongation and efficient re-initiation.

2 Einleitung

2.1 Synthese ribosomaler RNA

Die zelluläre Protein-Synthese wird durch Ribosomen katalysiert, die über 80 Proteine und 4 ribosomale RNAs (rRNAs) enthalten. In Eukaryoten werden die rRNAs gemäß ihres Sedimentationskoeffizienten als 5S, 5,8S, 18S und 28S rRNAs bezeichnet. Die drei größten rRNAs entstehen durch Prozessierung aus einer gemeinsamen Vorläufer-rRNA (45S rRNA), die von RNA-Polymerase I (Pol I) synthetisiert wird. In Menschzellen gibt es ca. 400 rRNA Gene, die sich auf die Chromosomen 13, 14, 15, 21, 22 verteilen (Henderson et al., 1972). Ungefähr 50% der zellulären Transkriptionsaktivität werden für die 45S rRNA-Synthese aufgewendet (Zylber und Penman, 1971; Reeder und Roeder, 1972), um die für die Translationskapazität notwendige Anzahl an Ribosomen zu gewährleisten. Aufgrund des hohen energetischen Aufwands unterliegt die rDNA-Transkription einer strengen und vielschichtigen Regulation. So erfolgt die Kontrolle der Pol I Aktivität durch den Wachstums- und Differenzierungszustand der Zelle, durch den Zellzyklus und durch extrazellulären Reize wie Nährstoffverfügbarkeit oder Hormoneinwirkung (Grummt, 1999; Reeder, 1999; Grummt, 2003).

2.2 Struktur der rRNA Gene

Die rDNA ist aus repetitiv angeordneten Transkriptionseinheiten aufgebaut. Dabei umfaßt jede Transkriptionseinheit einen für die 45S rRNA kodierenden Bereich sowie einen nicht-kodierenden Bereich mit regulatorischen DNA-Elementen (Abb. 2.1). Bei Mensch- und Mauszellen ist die nicht-kodierende, intergenische Region mit ca. 30 kbp deutlich länger als die codierende Region mit ca. 13 kbp (Gonzalez und Sylvester, 1995; Grozdanov et al., 2003). Bei den regulatorischen Sequenzen handelt es sich um den Gen-Promotor unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (+1) und die am 3'-Ende der kodierenden Region liegenden repetitiven Terminatoren (T_{1-10}), die für den Transkriptionsabbruch notwendig sind (Grummt et al., 1986a). Weiterhin befindet sich ca. 160-180 bp stromaufwärts von +1 ein transkriptionsstimulierendes Terminator-Element (T_0) (Grummt et al., 1986b), dem noch mehrere transkriptionsverstärkende *Enhancer*-Elemente sowie ein intergener Pol I Promotor vorgelagert sind.

Obwohl eukaryotische rDNA-Promotoren nur bei eng verwandten Spezies Sequenzübereinstimmungen aufweisen, ist bei ihnen dennoch eine strukturelle Gemeinsamkeit zu erkennen. So sind die meisten Promotoren aus zwei Modulen, einem

upstream control element (UCE) und einem *core promoter element* (CPE) aufgebaut (Moss, 1985). Das CPE reicht in einem *in vitro* Transkriptionssystem für die akkurate Initiation aus und umfaßt einen Bereich von ca. 40 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (Grummt, 1982; Yamamoto et al., 1984). Dieser Abschnitt ist für die spezifische Promotor-Erkennung durch den Transkriptionsapparat verantwortlich (Heix und Grummt, 1995; siehe auch 2.3). Durch Punktmutationsanalysen wurde eine weitere Feinkartierung des CPE der Maus erreicht. So gibt es eine distale Domäne (-22 bis -16), die für die Bindung des basalen Transkriptionsfaktors TIF-IB und somit für die Bildung eines stabilen Initiationskomplexes notwendig ist (Skinner et al., 1984; Kishimoto et al., 1985; Clos et al., 1986a; Nagamine et al., 1987). Mutationen in der proximalen Domäne (-15 bis -1), besonders an den Positionen -7 und -1, scheinen die Bindung von TIF-IB nicht zu beeinflussen, führen aber zu einer drastischen Verminderung der Transkriptionsaktivität (Clos et al., 1986b; Nagamine et al., 1987). Bisher konnte nicht geklärt werden, welche Funktion der proximalen Domäne bei der Initiation bzw. einem frühen Schritt der Pol I Transkription zukommt.

Das in der Maus im Bereich von -141 bis -111 lokalisierte UCE ist für eine effiziente Transkription notwendig und kann die Pol I Aktivität *in vitro* um den Faktor 3 bis 5 steigern (Grummt, 1982; Miller et al., 1985). *In vivo* ist dieser Effekt deutlich stärker, so daß es zu einer 100-fachen Steigerung kommt (Haltiner et al., 1986; Jones et al., 1988). Die UCE-Sequenz scheint mit dem CPE in kooperativer Weise bestimmte Initiationsfaktoren zu binden und dadurch zur Stabilisierung des Initiationskomplexes beizutragen (Learned et al., 1986; Nagamine et al., 1987).

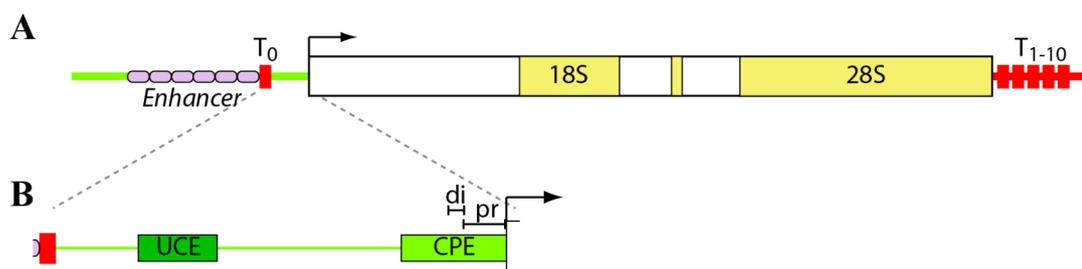


Abb. 2.1: Strukturelle Organisation der rDNA-Transkriptionseinheit und des rDNA-Promotors.

(A) Das Schema zeigt die für die 45S rRNA kodierende Region (weiße Box, die für die 18S, 5,8S und 28S rRNA kodieren Bereiche sind gelb unterlegt) und den Transkriptionsstartpunkt (Pfeil). Von der intergenischen Region stromaufwärts des Promotors sind das transkriptionsstimulierende Terminator-Element (T₀) sowie die *Enhancer*-Elemente dargestellt. Die repetitiven Terminatoren (T₁₋₁₀) am 3'-Ende des rRNA-Gens sind ebenfalls eingezeichnet.

(B) Modularer Aufbau des rDNA-Promotors aus *upstream control element* (UCE) und *core promoter element* (CPE). Dargestellt sind die Positionen von UCE (dunkelgrüne Box) und CPE (hellgrüne Box) relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Die Lage der distalen Domäne (di) sowie der proximalen Domäne (pr) im CPE ist ebenfalls gezeigt.

2.3 Der initiationskompetente Pol I Transkriptionsapparat

Während die σ -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase die Promotor-Erkennung vermittelt, besitzen eukaryotische RNA-Polymerasen keine Sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften. Sie sind daher auf akzessorische Proteinfaktoren für die Positionierung am Promotor angewiesen. In den vergangenen zwanzig Jahren wurden die basalen Komponenten des Pol I Initiationskomplexes zunächst durch biochemische Reinigung, später durch Klonierung der zugehörigen Gene identifiziert. Hierbei war vor allem die Etablierung eines zellfreien Transkriptionssystems mit klonierter rDNA als Matrize (Grummt, 1981a+b; Learned and Tijan, 1982) von großem Nutzen, da in rekonstituierten Systemen partiell gereinigte Fraktionen und Faktoren sowie später auch rekombinant exprimierte Faktoren in verschiedenen Kombinationen getestet werden konnten. Nach heutigem Wissensstand enthält der basale, initiationskompetente Pol I Komplex, der auch als Prä-Initiationskomplex bezeichnet wird, drei akzessorische Faktoren, den *Upstream Binding Factor* UBF sowie die Transkriptionsinitiationsfaktoren TIF-IA und TIF-IB (Übersicht in Grummt, 1999; Grummt, 2003; Comai, 2004; Russell und Zomerdijs, 2006). Im folgenden werden die Komponenten des basalen Pol I Initiationskomplexes im einzelnen kurz dargestellt:

Pol I: Pol I aus Hefe ist ein ca. 600 kDa Komplex, der aus 14 Untereinheiten besteht (Übersicht in Carles und Riva, 1998). Die beiden größten Untereinheiten RPA190 und RPA135, weisen Sequenz-Homologien zu den β' - und β -Untereinheiten der prokaryotischen RNA-Polymerase auf und übernehmen einen Großteil der enzymatischen Funktionen. Der α_2 -Dimer sowie die ω -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase sind ebenfalls strukturell und funktionell in eukaryotischen RNA-Polymerasen konserviert (Übersicht in Cramer, 2002). Daneben sind 4 weitere Untereinheiten, die wie das ω -Homologe Bestandteil aller drei eukaryotischen RNA-Polymerasen sind, für die basale Transkriptionsaktivität notwendig. Zusätzlich enthält Pol I ein Heterodimer (RPA14/RPA43), zu dem es Homologe in Pol II und III gibt, sowie drei für Pol I spezifische Untereinheiten (RPA12.2, 34.5 und 49). Mit Ausnahme von RPA14 wurden in Maus und Mensch jeweils Homologe zu den Untereinheiten von Pol I aus Hefe gefunden (Übersicht in Russell und Zomerdijs, 2006). Interessanterweise vermitteln zwei Pol I-spezifische Untereinheiten den direkten Kontakt zu den Promotor-gebundenen Faktoren. Der zu RPA49 homologe Faktor PAF53 bindet an UBF (Hanada et al., 1996; Seither et al., 1997), während das RPA34.5-Homologe PAF49 mit TIF-IB in Mauszellen (Yamamoto et

al., 2004) bzw. mit UBF in Menschzellen (Whitehead et al., 1997; Panov et al., 2006) interagiert.

TIF-IA: TIF-IA ist das Säugetier-Homologe zu dem essentiellen Pol I Transkriptionsfaktor Rrn3p aus Hefe (Bodem et al., 2000; Moorefield et al., 2000). Beide Faktoren kontaktieren Pol I über die RPA43 Untereinheit. Darüber hinaus interagiert TIF-IA mit TIF-IB bzw. Rrn3p mit dem *core factor*, der in Hefe eine ähnliche Funktion wie TIF-IB hat (Peyroche et al., 2000; Yuan et al., 2002; Cavanaugh et al., 2002). TIF-IA/Rrn3p fungiert somit als „Bindeglied“ zwischen Pol I und den Promotor-gebundenen Initiationsfaktoren (Miller et al., 2001; Yuan et al., 2002). Allerdings sind nur etwa 10% der Pol I Komplexe in Mensch- und Hefezellen mit TIF-IA/Rrn3p assoziiert (Milkereit et al., 1998; Miller et al., 2001). Für diese als Pol I β bezeichnete, initiationskompetente Subpopulation der Pol I Komplexe ist in Säugern außerdem die Bindung eines weiteren Faktors, PAF67, charakteristisch (Seither et al., 2001). Interessanterweise konnte auch eine direkte Interaktion zwischen TIF-IA und PAF67 nachgewiesen werden (Yuan et al., 2002).

UBF: UBF liegt in proliferierenden Wirbeltierzellen in hoher Kopienzahl (ca. 5×10^5 Moleküle pro Zelle) vor und zeichnet sich durch den Besitz mehrerer *High-Mobility-Group-* (HMG-) Domänen aus (Jantzen et al., 1990). Die HMG-Domänen binden an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix, so daß UBF eine allgemeine Affinität zu DNA aufweist. Dennoch bindet ein UBF-Dimer spezifisch an UCE und CPE des rDNA-Promotors und krümmt einen Bereich von etwa 140 bp um 360° (Bazett-Jones et al., 1994). Diese strukturelle Organisation des Promotors bringt vermutlich UCE und CPE in eine enge räumliche Nähe, was möglicherweise die Assoziation von TIF-IB mit beiden Promotor-Abschnitten erlaubt (Jantzen et al., 1992). Zusätzlich interagiert die carboxyterminale Domäne von UBF auch direkt mit zwei Untereinheiten von TIF-IB, TBP und TAF₁₄₈ (Beckmann et al., 1995; Tuan et al., 1999). Neben seiner Rolle bei der Bildung des Prä-Initiationskomplexes erfüllt UBF eine generelle Funktion bei der Strukturierung der rDNA. Mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationsexperimenten konnte eine Verteilung von UBF über die gesamte rDNA-Transkriptionseinheit in Wirbeltieren nachgewiesen werden (O'Sullivan et al., 2002; Mais et al., 2005). Um die strukturelle Funktion von UBF näher zu untersuchen, wurden rDNA-Abschnitte aus *Xenopus*, von denen bekannt ist, daß sie auch humanes UBF binden, in Menschzellen eingeführt. Durch die Integration dieser heterologen Sequenzen innerhalb verschiedener Chromosomen, konnte gezeigt werden, daß allein die Rekrutierung von UBF eine rDNA-typische Chromatin-Architektur bewirkt (Mais et al., 2005).

TIF-IB: Obwohl der Pol I Transkriptionsapparat von Wirbeltieren einen hohen Grad an Konservierung aufweist, wurde schon vor über zwei Jahrzehnten beobachtet, daß die Erkennung des rDNA-Promotors Art-spezifisch ist (Grummt et al., 1982). Während Pol I, TIF-IA und UBF zwischen Mensch- und Maus-Transkriptionssystemen ausgetauscht werden können (Bell et al., 1990; Schnapp et al., 1993; Rudloff et al., 1994), ist TIF-IB nur im homologen System funktionell und stellt somit den Faktor dar, der die Promotor-Spezifität vermittelt. Trotzdem besitzen die 4 Untereinheiten von TIF-IB in Säugern einen hohen Grad an Homologie. TIF-IB, der beim Menschen auch als *Selectivity Factor 1* (SL1) bezeichnet wird, besteht aus dem TATA-bindenden-Protein TBP, und drei TBP-assoziierten Faktoren TAF₁48, TAF₁68 (Mensch: TAF₁63) und TAF₁95 (Mensch: TAF₁110) (Eberhard et al., 1993; Comai et al., 1994; Zomerdijk et al., 1994; Heix et al., 1997). Während TBP und TAF₁48 an UBF binden, interagieren TAF₁68/63 und TAF₁95/110 mit TIF-IA und kontaktieren direkt den Promotor (Beckmann et al., 1995; Yuan et al., 2002). Durch Exonuklease III und DNase I Schutzexperimente sowie durch *in vitro* Transkriptionsanalysen wurde gezeigt, daß TIF-IB den rDNA-Promotor nur schwach bindet und eine basale Transkription ermöglicht, daß aber Promotor-Bindung und Transkriptionsstimulation kooperativ durch UBF verstärkt werden (Bell et al., 1988; Bell et al., 1990; Schnapp und Grummt, 1991; Friedrich et al., 2005).

Der Initiationskomplex aus Pol I, UBF, TIF-IA und TIF-IB stellt die „Minimalausstattung“ für die *run off*-Transkription an linearisierten rDNA-Matrizen *in vitro* dar. Frühere Studien schlugen eine sequentielle Bildung des Initiationskomplexes vor, bei der auf die kooperative Promotor-Bindung von UBF und TIF-IB die Rekrutierung von Pol Iβ folgt (Schnapp und Grummt, 1991). Die chromatographische Reinigung von Pol I aus verschiedenen Wirbeltieren und Pflanzen zeigte aber, daß *in vivo* ein Teil von Pol I als „Holoenzym“-Komplex von über 1 bis 2 MDa vorliegt, der zur Promotor-spezifischen Transkription befähigt ist (Saez-Vasquez und Pikaard; 1997; Seither et al., 1998; Albert et al., 1999). Hieraus lassen sich zwei Schlußfolgerungen ziehen. Zum einen bildet zumindest ein Teil der Transkriptionsfaktoren mit Pol I bereits in Lösung ein initiationskompetentes Holoenzym, zum anderen ist die Zusammensetzung dieses Holoenzym komplexer als die des basalen Transkriptionsapparates. Die Komplexität des Holoenzym spiegelt die verschiedenen Anforderungen an die rDNA Transkription in der Zelle wider. So wurden Pol I-assoziierte Proteine gefunden, die durch kovalente Modifikation bestimmter Pol I Komponenten deren Aktivität regulieren (Hannan et al., 1998; Muth et al., 2001; Saez-Vasquez et al., 2001), die die Bewegung von Pol I durch die

Chromatin-Struktur der rDNA ermöglichen (Percipalle et al., 2006) oder die für die Reparatur von DNA-Schäden notwendig sind (Iben et al., 2002; Bradsher et al., 2002). In Abb. 2.2 ist der Pol I Initiationskomplex schematisch dargestellt, wobei der Einfachheit halber nur die basalen Komponenten berücksichtigt werden.

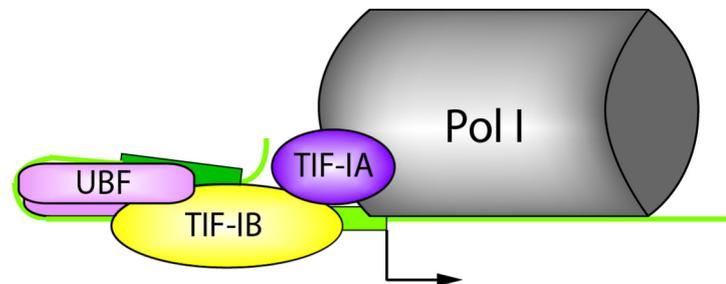


Abb. 2.2: Der basale Pol I Prä-Initiationskomplex.

Die Abbildung zeigt schematisch den am rDNA-Promotor im Bereich des Transkriptionsstartpunkts (Pfeil) gebundenen initiationskompetenten Pol I Komplex. Neben Pol I sind die basalen Transkriptionsfaktoren UBF, TIF-IB und TIF-IA dargestellt. Das Schema berücksichtigt, daß durch Bindung eines UBF-Dimers die Promotor-DNA gekrümmt wird, wodurch die Assoziation von TIF-IB mit UCE (dunkelgrüne Box) und CPE (hellgrüne Box) ermöglicht wird.

2.4 Der Pol I Transkriptionszyklus

Die Transkription kann als ein zyklischer Prozeß mit 5 Phasen angesehen werden. Beginnend mit der Positionierung der RNA-Polymerase am Promotor durch die Bildung des Prä-Initiationskomplexes wird zunächst der DNA-Doppelstrang im Bereich des Transkriptionsstartpunkts aufgeschmolzen, um den Zugang zum kodierenden Strang zu ermöglichen. Anschließend wird die Synthese der ersten Phosphodiester-Bindungen initiiert. Unter Auflösung des Initiationskomplexes verläßt die RNA-Polymerase den Promotor (*Promoter-Escape*) und geht in die Elongationsphase über. Am 3'-Ende des Gens erfolgt mit der Dissoziation der RNA-Polymerase und des Transkripts von der DNA die Transkriptionstermination, wonach die RNA-Polymerase in einen neuen Prä-Initiationskomplex inkorporiert werden kann. Obwohl dieses Schema die Grundzüge des Transkriptionsprozesses wiedergibt, so berücksichtigt es doch mindestens zwei bedeutende Aspekte nicht. Zum einen sind alle RNA-Polymerasen auf eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren angewiesen, die nicht nur an der Bildung des Prä-Initiationskomplexes beteiligt sind, sondern auch in späteren Transkriptionsabschnitten benötigt werden. Zum anderen sind die Transkriptionszyklen nicht gleichförmig. Vielmehr

bleiben meistens nach dem initialen Zyklus bestimmte Protein-DNA Intermediate bestehen, die die Re-Initiation erleichtern und so die Prozessivität der Transkription steigern. Im folgenden wird der Pol I Transkriptionszyklus detaillierter beschrieben (siehe Abb. 2.3):

Bildung des Prä-Initiationskomplexes und Initiation: Nach Bildung des Pol I Prä-Initiationskomplexes (siehe 2.3) erfolgen Trennung des DNA-Doppelstrangs im Bereich von +1 und Synthese der ersten Phosphodiester-Bindungen. In dieser Initiationsphase wirken die Interaktionen von Pol I mit den Promotor-gebundenen Faktoren der Bewegung des transkribierenden Enzyms entgegen. Besonders unter Limitierung von Nukleosid-Triphosphaten kommt es hierdurch bei prokaryotischen und eukaryotischen RNA-Polymerasen zur abortiven Transkription, bei der wiederholt nur kurze Transkripte mit einer Länge von drei bis 16 Nukleotiden gebildet werden, ohne daß die RNA-Polymerase den Promotor verläßt (McClure et al., 1978; Luse und Jacob, 1987; Kassavetis et al., 1992).

Promoter-Escape: Der molekulare Mechanismus des Übergangs von der Initiation zur produktiven Transkription ist noch weitgehend unverstanden. Allerdings wurde vor kurzem die stimulierende Funktion von UBF beim *Promoter-Escape* erkannt (Panov et al., 2006). *In vitro* Transkriptionsanalysen mit immobilisierten rDNA Matrizen zeigten, daß nach Beginn der produktiven Transkription UBF und TIF-IB am Promotor verbleiben. Dabei stabilisiert die Bindung von TIF-IB die transiente UBF-Assoziation (Panov et al., 2001; Friedrich et al., 2005). Hierdurch wird die Bildung eines neuen Prä-Initiationskomplexes erleichtert und so die Effizienz der Re-Initiation gesteigert.

Elongation: Im Gegensatz zu UBF und TIF-IB dissoziiert TIF-IA erst nach dem *Promoter-Escape* von Pol I. Bier et al. (2004) zeigten, daß in Hefe Rrn3p mit dem Promotor, nicht aber mit dem 3'-Ende des rRNA Gens assoziiert ist. In der gleichen Studie wurde mit Hilfe eines zellfreien Transkriptionssystems die Dissoziation von Rrn3p auf den Bereich zwischen +1 und +34 lokalisiert. In Übereinstimmung mit diesen Daten wird in Säugern die Interaktion zwischen TIF-IA und Pol I ebenfalls im Verlauf der Elongation aufgehoben (Hirschler-Laszkiewicz et al., 2003). Darüber hinaus erfolgt auch eine Inaktivierung von TIF-IA, die unter *in vitro* Transkriptionsbedingungen kurz nach der Verknüpfung der ersten 37 Nukleotide stattfindet (Brun et al., 1994; Hirschler-Laszkiewicz et al., 2003). Obwohl in den letzten 4 Jahren die Regulation der TIF-IA Aktivität durch reversible Phosphorylierung zum großen Teil aufgeklärt werden konnte (siehe 2.5), ist die transkriptionsgekoppelte Dissoziation/Inaktivierung dieses Faktors noch

unverstanden. Allerdings scheint sie auch durch eine reversible Modifikation von TIF-IA bewirkt zu werden, da Prä-Initiationskomplexe, die mit Hilfe einer immobilisierten rDNA Matrize isoliert wurden und entsprechend nur ein TIF-IA Molekül pro Komplex enthalten, zu mehreren sukzessiven Transkriptionszyklen fähig sind (Panov et al., 2001).

Termination: Am 3'-Ende der kodierenden Region wird Pol I durch den Transkriptionsterminationsfaktor I (TTF-I) gestoppt (Grummt et al., 1986a; Bartsch et al., 1988). Der arretierte ternäre Komplex wird anschließend durch den *Pol I and Transcript Release Factor* (PTRF) aufgelöst (Mason et al., 1997; Jansa et al., 1998; Jansa et al., 1999). Des weitem erleichtert die PTRF Aktivität die Überführung von Pol I in eine wieder initiationskompetente Form und stimuliert damit indirekt die Re-Initiation (Jansa et al., 2001).

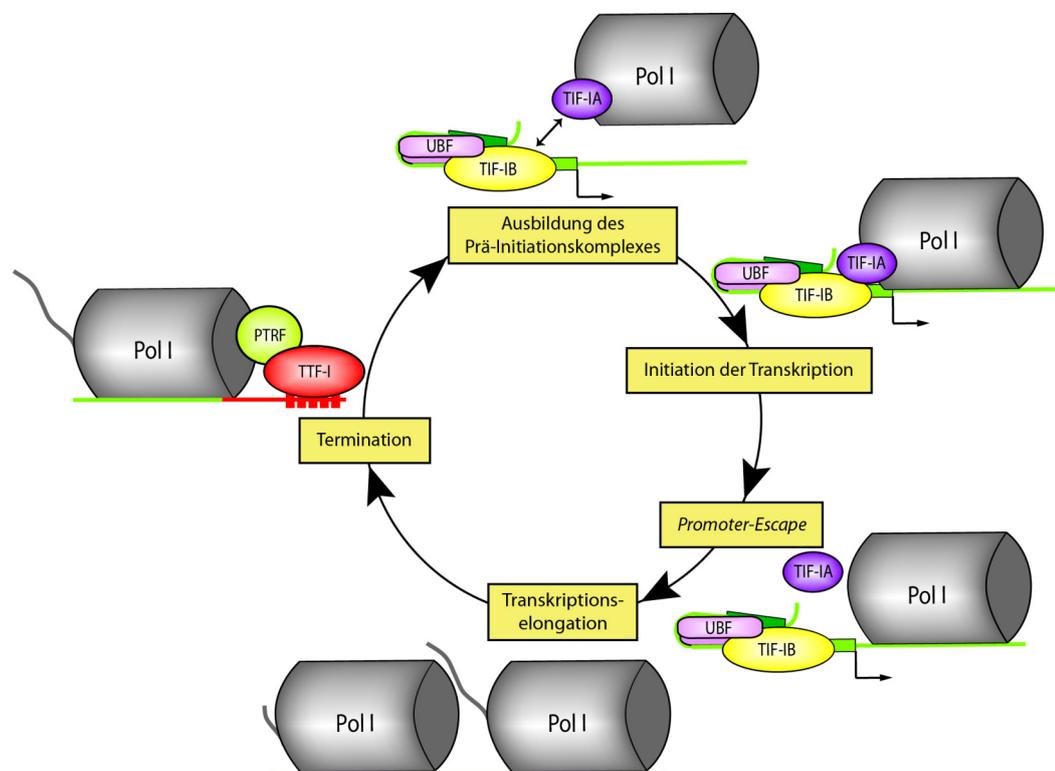


Abb. 2.3: Der Pol I Transkriptionszyklus.

In dem Schema sind die fünf Phase des zyklischen Transkriptionsprozesses dargestellt. Beginnend mit der Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes durch die von TIF-IA vermittelte Rekrutierung von Pol I an den Promotor-gebundenen UBF-TIF-IB-Komplex erfolgt die Transkriptionsinitiation. Kurz nach oder bei dem *Promoter-Escape* erfolgt die Dissoziation von TIF-IA von Pol I, wonach Pol I in die Elongationsphase übergeht. Am 3'-Ende des rRNA-Gens erfolgt der Abbruch der Transkription durch die Terminationsfaktoren TTF-I und PTRF. Pol I kann nach der Dissoziation von der DNA und erneuter Interaktion mit TIF-IA wieder in einen Prä-Initiationskomplex inkorporiert werden.

2.5 Regulation der Pol I Transkription durch Phosphorylierung von TIF-IA

Buttgereit et al. (1985) entdeckten TIF-IA ursprünglich als eine Aktivität, die nur in proliferierenden Zellen vorkommt und die die Pol I Transkription in Extrakten aus wachstumsarretierten Zellen wiederherstellen kann. Später konnte die spezifische Inaktivierung von TIF-IA auch unter anderen metabolischen Mangel-Bedingungen, wie Aminosäure-Entzug und Inhibierung der Proteinsynthese durch Behandlung mit Cycloheximid, beobachtet werden (Schnapp et al., 1990). Da zu dieser Zeit die molekulare Identität von TIF-IA noch nicht bekannt war, konnte nicht entschieden werden, ob der Verlust der TIF-IA Aktivität auf eine Degradation oder Modifikation des Faktors zurückzuführen ist. Schnapp et al. (1990) postulierten allerdings einen Regulationsmechanismus, der auf reversibler Phosphorylierung von TIF-IA beruht. Erst nach Klonierung der TIF-IA cDNA (Bodem et al., 2000; Moorefield et al., 2000) und der Herstellung spezifischer Antikörper konnte TIF-IA hinsichtlich Stabilität und post-translationaler Modifikationen untersucht werden. Hierbei wurde unter wachstumshemmenden, TIF-IA inaktivierenden Bedingungen keine Veränderung der Menge, aber eine Änderung im Phosphorylierungsstatus von TIF-IA beobachtet (Yuan et al., 2002; Cavanaugh et al., 2002). Diese Studien lieferten einen ersten Beweis dafür, daß die Regulation der TIF-IA Aktivität über reversible Phosphorylierung erfolgt.

In den letzten Jahren wurden mehrere Phosphorylierungsstellen im TIF-IA-Polypeptid sowie die zugehörigen Kinasen identifiziert. So konnten Zhao et al. (2003) zeigen, daß TIF-IA nach Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren von zwei Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP Kinasen), *extracellular signal related kinase* (ERK) und *ribosomal S6 kinase* (RSK), an den Serinresten 633 und 649 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierungen sind für die TIF-IA Aktivität essentiell und zumindestens die RSK-vermittelte Phosphorylierung ist für die Interaktion mit Pol I notwendig (Zhao et al., 2003; Philimonenko et al., 2004).

Die Sensitivität von TIF-IA gegenüber Nährstoffmangel konnte durch die Verwendung von Rapamycin, einem Inhibitor der Kinase TOR (*target of rapamycin*) aufgeklärt (Mayer et al., 2004). TOR sowie Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktivieren nach Stimulation der Zellproliferation über eng vernetzte Signalkaskaden die mRNA-Translation (Übersicht in Shamji et al., 2003). Während PI3K durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird, kommt TOR eine Schlüsselfunktion bei der Kontrolle der Biosynthese-Kapazität der Zelle in Abhängigkeit von ihrer Nährstoff-Versorgung zu. Der TOR-Signalweg beinhaltet die Aktivierung der *S6 ribosomal protein kinase 1* (S6K1)

und die Inhibierung von Protein-Phosphatase 2A und verwandten Phosphatasen (Burnett et al., 1998; Peterson et al., 1999). Neben der über S6K1 vermittelten Regulation des Translationsapparates konnte ein Einfluß von TOR auf die rRNA Synthese in Hefezellen nachgewiesen werden (Powers und Walter, 1999). Die Behandlung von Mensch- und Maus-Zellen mit Rapamycin führt zu einer deutlichen Verminderung der Pol I Aktivität durch Inaktivierung von TIF-IA, die mit einer Hypophosphorylierung von Serin 44 und einer Hyperphosphorylierung von Serin 199 korreliert (Mayer et al., 2004). Die Phosphorylierung von Serin 44 wird durch eine Cyclin-abhängige Kinase katalysiert, ist essentiell für die TIF-IA Aktivität und wird durch Protein Phosphatase 2A revertiert (Mayer et al., 2004). Da eine Inhibierung von TOR mit einer Erhöhung der Protein Phosphatase 2A Aktivität einhergeht, läßt sich die Rapamycin-induzierte TIF-IA Inaktivierung und Hypophosphorylierung von Serin 44 erklären. Der Signalweg, der nach Inhibierung von TOR zur Hyperphosphorylierung von Serin 199 führt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Allerdings konnten Mayer et al. (2004) zeigen, daß an Serin 199 phosphoryliertes TIF-IA weder mit Pol I noch mit TIF-IB interagieren kann und darüber hinaus vom Zellkern ins Zytoplasma exportiert wird.

Neben Nährstoffmangel führen auch verschiedene Formen von zellulärem Streß wie Ribotoxizität oder Induktion von Sauerstoff-Radikalen zu einer starken Abnahme der 45S rRNA Synthese sowie der TIF-IA Aktivität (Mayer et al., 2005). Durch Verwendung entsprechender *knockout* Zellen konnte die c-Jun N-terminale Kinase 2 (JNK2) als Vermittler dieser Streß-Stimuli identifiziert werden. JNK2 ist eine Streß-induzierte MAP Kinase (Übersicht in Karin et al., 1997) und phosphoryliert TIF-IA an Threonin 200 (Mayer et al., 2005). Ähnlich wie bei Serin 199 beeinträchtigt die Phosphorylierung von Threonin 200 die transkriptionelle Aktivität sowie die Interaktionen mit Pol I und TIF-IB und bewirkt die Translokation von TIF-IA vom Nukleolus ins Nukleoplasma.

Zusätzlich zu den erwähnten Phosphorylierungsstellen wurden durch Massenspektrometrische Analyse zwei weitere Phospho-Serine an den Positionen 170 und 172 in TIF-IA entdeckt (Schlosser et al., 2002). Diese beiden Serine liegen in einem Sequenzabschnitt, der von Aspartat- und Glutamatresten dominiert wird, so daß sich jeweils an Position drei nach Serin 170 und 172 eine dieser beiden sauren Aminosäuren befindet. Damit sind beide Serine in das Konsensus-Erkennungsmotiv für die Proteinkinase CK2 eingebettet (Meggio und Pinna, 2003). Allerdings wurde bisher weder die Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2 nachgewiesen, noch die Relevanz der Phosphorylierung von Serin 170/172 untersucht. In Abb. 2.4 sind die bisher entdeckten

TIF-IA-Phosphorylierungsstellen sowie die zugehörigen, soweit bekannten Kinasen schematisch zusammengefaßt.

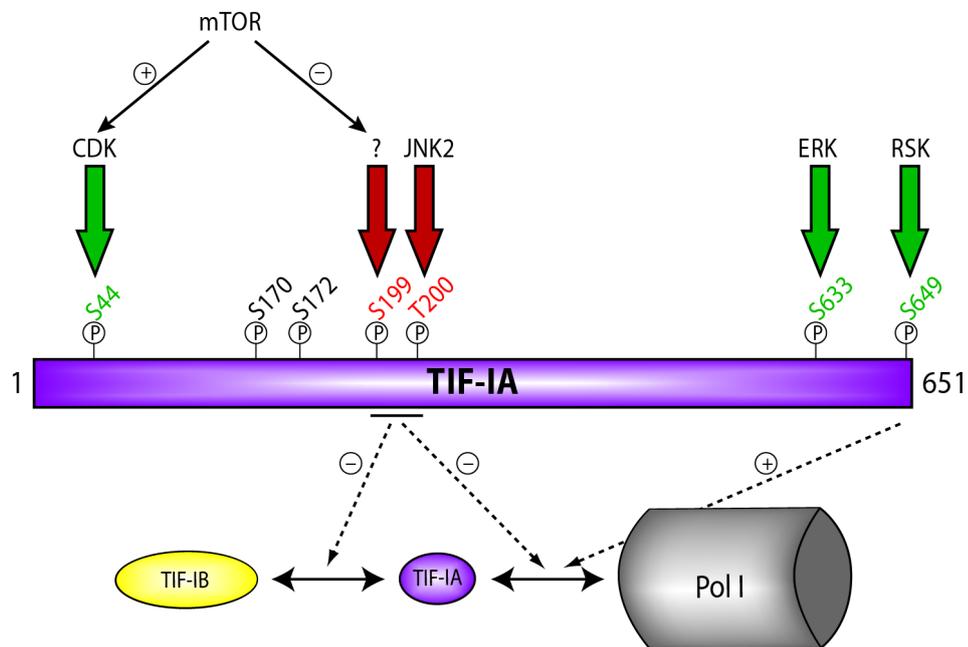


Abb. 2.4: Übersicht der Phosphorylierungsstellen in TIF-IA sowie der zugehörigen Kinasen.

Soweit bekannt, sind aktivierende Phosphorylierungen grün, inaktivierende Phosphorylierungen rot dargestellt. Ebenfalls ist die Regulation der Interaktion von TIF-IA mit TIF-IB bzw. mit Pol I in Abhängigkeit einzelner Phosphorylierungen eingezeichnet ((+): notwendig für die Interaktion; (-): inhibiert die Interaktion). Für die Erläuterung der zugehörigen Signalwege siehe Text.

2.6 Die Proteinkinase CK2

CK1 und CK2 wurden 1954 als erste Protein-Kinasen durch Burnett und Kennedy entdeckt. Da die Autoren für den Nachweis der Kinase-Aktivität in Leberextrakten Kasein als Substrat einsetzten, wurden zunächst die Bezeichnungen *Casein Kinase 1* und *2* verwendet. Später wurde die Abkürzung „CK“ bevorzugt, um die physiologisch irrelevante Verbindung zu Casein bei der Benennung zu umgehen. CK2 ist eine in Eukaryoten ubiquitär vorkommende, stark konservierte Kinase, die Serin- und Threoninreste innerhalb von sauren Peptidabschnitten phosphoryliert (Meggio und Pinna, 2003). Für die Substrat-Erkennung ist ein Aspartat- oder Glutamatrest an Position 3 nach dem Serin bzw. Threonin besonders kritisch (Meggio et al., 1984; Marin et al., 1986) und bei 90% der bisher identifizierten CK2-Phosphorylierungsstellen zu finden (Meggio und Pinna, 2003). In der Zelle liegt CK2 überwiegend als Tetramer vor, das sich aus zwei katalytischen α -Untereinheiten und zwei regulatorischen β -Untereinheiten zusammensetzt (Thornburg und Lindell, 1977). In Säugern gibt es zwei, sich hauptsächlich im C-

terminalen Bereich unterscheidende α -Untereinheiten (α und α'), so daß sowohl $\alpha_2\beta_2$ - als auch $\alpha\alpha'\beta_2$ -Holoenzyme in der Zelle vorliegen. Daneben gibt es mehrere Studien, die auf eine biologische Funktion der isolierten α - und β -Untereinheiten hinweisen (Übersicht in Litchfield et al., 2003).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Protein-Kinasen, deren Aktivität durch *second messenger* oder Phosphorylierung reguliert wird, weisen sowohl die α -Untereinheiten alleine als auch das CK2-Tetramer eine konstitutive Kinase-Aktivität auf (Pinna, 2003). Entsprechend erfolgt die Regulation von CK2 nicht durch einen der klassischen Signaltransduktionswege und wird bisher nur ansatzweise verstanden. Vermutet wird aber, daß die β -Untereinheit, für die schon viele Interaktionspartner nachgewiesen wurden (Übersicht in Guerra und Issinger, 1999), die Selektion und Rekrutierung bestimmter Substrat-Proteine vermittelt (Übersicht in Filhol et al., 2004). Eine Substrat-Spezifität wird zusätzlich erreicht, indem die subzelluläre CK2-Lokalisation durch verschiedene physiologische Stimuli beeinflusst wird (Guo et al., 1999; Gerber et al., 2000). Passend zu der konstitutiven Aktivität phosphoryliert CK2 auch eine ungewöhnlich große Anzahl von Proteinen. Meggio und Pinna (2003) listeten in einem Übersichtsartikel 307 Proteine auf, bei denen die Phosphorylierung durch CK2 sowohl *in vitro* als auch größtenteils *in vivo* nachgewiesen wurde. Die Analyse des Phosphoproteoms in Hefe ergab zudem, daß bei 22-35% der Protein-Phosphorylierungen das Phospho-Serin/Threonin in einer CK2-Konsensus-Sequenz liegt (Ficarro et al., 2002). CK2 überträgt Phosphatreste auf Signaltransduktionsproteine, Transkriptions- und Translationsfaktoren, Zellzyklus-Regulatoren, Stoffwechsellzyme und Struktur-Proteine (Übersicht in Meggio und Pinna, 2003). Damit ist CK2 an praktisch allen physiologischen Prozessen in der Zelle beteiligt und besitzt nicht nur eine distinkte Funktion. Die Bedeutung von CK2 für die Zelle wird dadurch deutlich, daß die Deletion beider CK2 α -Gene in der Hefe sowie der *knockout* der β -Untereinheit in der Maus letal sind (Glover, 1998; Buchou et al., 2003).

2.7 CK2-abhängige Regulation der Transkription

Bisher sind insgesamt über 60 Transkriptionsfaktoren und basale Transkriptionskomponenten aller drei eukaryotischer RNA-Polymerasen bekannt, die durch CK2 phosphoryliert werden. Daher ist zu vermuten, daß CK2 einen bedeutenden Beitrag zur Regulation der Expression von Klasse I, II und III Genen leistet. Allerdings konnte erst in wenigen Fällen der Regulationsmechanismus, der durch CK2-abhängige Phosphorylierung einer Transkriptionskomponente induziert wird, aufgeklärt werden. Im

folgenden soll der Einfluß von CK2 auf die Transkriptionsregulation anhand einiger Beispiele dargestellt werden.

Klasse III Gene: In Hefe ist CK2 für die tRNA- und 5S rRNA-Synthese essentiell (Hockman und Schultz, 1996) und vermittelt über Phosphorylierung von TBP die Promotor-Rekrutierung von TFIIB (Ghavidel und Schultz, 1997; Ghavidel et al., 1999; Ghavidel und Schultz, 2001). Werden Hefezellen genotoxischem Streß, wie z.B. erhöhter UV-Licht-Bestrahlung ausgesetzt, erfolgt eine drastische Verminderung der Pol III Transkription (Ghavidel und Schultz, 2001). Dieser Effekt wird durch Dissoziation der CK2 α -Untereinheit von der TBP-gebundenen β -Untereinheit und somit durch eine TBP-Hypophosphorylierung erzielt. Die Konservierung der physischen und funktionellen Interaktion zwischen CK2 und TFIIB wurde auch in Säugern nachgewiesen. Allerdings wird hier die TFIIB-Assoziation mit den tRNA- und 5S rRNA-Genpromotoren durch CK2-abhängige Phosphorylierung von Brf1 stimuliert (Johnston et al., 2002). Die Transkription von Pol III Genen mit einem Typ 3 Promotor, wie beispielsweise das U6 snRNA Gen, wird ebenfalls, wenn auch in anderer Form durch CK2 reguliert. Während die Phosphorylierung von Pol III oder einem eng assoziierten Protein in diesem Fall essentiell ist, wirkt die Phosphorylierung der Bdp1-Untereinheit des Brf2-TFIIB-Komplexes inhibierend (Hu et al., 2003; Hu et al., 2004). Da die CK2-abhängige Bdp1-Phosphorylierung in der Mitose erfolgt, handelt es sich hier um eine Zellzyklus-spezifische Regulation der Pol III Aktivität.

Klasse II Gene: An der Kontrolle der Transkription Protein-kodierender Gene ist CK2 unter anderem durch eine Erhöhung der Stabilität bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Myc und β -Catenin, beteiligt. C-Myc und β -Catenin werden durch Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert und dadurch für die Proteasom-abhängige Degradation markiert. Durch CK2-abhängige Phosphorylierung wird der Phosphorylierung durch GSK3 entgegengewirkt und so die Degradation von c-Myc und β -Catenin verhindert (Song et al., 2000; Channavajhala und Seldin, 2002; Song et al., 2003). Somit stimuliert CK2 indirekt die Expression der c-Myc- und β -Catenin-abhängigen Gene. Eine direkte Funktion von CK2 bei der Erkennung verschiedener Pol II Promotor-Elemente wurde erst kürzlich entdeckt. Klasse II Genpromotoren unterscheiden sich unter anderem in zwei Sequenzelementen, *downstream promoter element* (DPE) und *downstream core element* (DCE), die stromabwärts des Transkriptionsstartpunkt liegen (Burke und Kadonaga, 1997; Lewis et al., 2000). Lewis et al. (2005) konnten zeigen, daß CK2 essentiell für die Transkription von Genen, die einen DPE-Promotor enthalten, ist. Im Gegensatz dazu, hat

CK2 keinen Effekt auf Promotoren mit einem Wildtyp-DCE, führt aber bei Genen mit mutiertem DCE zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate auf Wildtyp-Niveau (Lewis et al., 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen ist es wahrscheinlich, daß CK2 durch Phosphorylierung von TAF1 (Sekiguchi et al., 1991) die Konformation von TFIID verändert und so die Spezifität der TFIID-Bindung von DCE- auf DPE-Promotoren verlagert.

Klasse I Gene: Obwohl frühere Studien zeigten, daß CK2 mit dem Pol I Holoenzym von Ratte, *Xenopus* und Brokkoli assoziiert ist (Hannan et al., 1999; Albert et al., 1999; Saez-Vasquez et al., 2001), konnten sie den Einfluß von CK2 auf die rDNA Transkription nicht näher aufklären. Dagegen wurde eine CK2-vermittelte Regulation der transkriptionellen Aktivität von UBF aus Maus nachgewiesen (Voit et al., 1992; Voit et al., 1995). UBF besitzt eine saure C-terminale Domäne mit 9 Serinen, die jeweils in einer CK2-Konsensus-Sequenz liegen. Der Austausch dieser Serinreste gegen Alaninreste verhindert die Phosphorylierung durch CK2 und verringert die UBF-Aktivität auf ca. ein Drittel (Voit et al., 1995). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde kürzlich die CK2-abhängige Phosphorylierung von UBF in Menschzellen gezeigt (Panova et al., 2006; Lin et al., 2006). Auch hier stimuliert CK2 die UBF-Aktivität um ca. das Dreifache und führt zu einer verstärkten, TIF-IB-abhängigen Assoziation von UBF mit dem rDNA-Promotor. Darüber hinaus wurde in der Studie von Panova et al. (2006) die CK2-vermittelte Phosphorylierung von Pol I β -assoziiierter Topoisomerase II α und TAF₁₁₀ nachgewiesen. Interessanterweise wirkt die TAF₁₁₀-Phosphorylierung inhibierend auf die rDNA-Transkription indem sie die Bindung von TIF-IB an den rDNA-Promotor verhindert (Panova et al., 2006). Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, daß CK2 verschiedene regulatorische Funktionen bei der Pol I Transkription hat.

2.8 Problemstellung

In den vergangenen 2 Jahrzehnten wurden die an der Initiation der Pol I Transkription beteiligten Faktoren sowie die für ihre Bindung notwendigen Sequenz-Elemente im rDNA-Promotor identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß nach der Bindung des basalen Faktors TIF-IB an das *core promoter element* der Prä-Initiationskomplex bestehend aus TIF-IB, UBF, TIF-IA und Pol I am rDNA-Promotor ausgebildet wird. Dieser Prozeß wird durch post-translationale Modifikationen einzelner Faktoren reguliert und dadurch die rRNA Synthese dem physiologischen Status der Zelle angepaßt. Eine entscheidende Rolle bei der wachstumsabhängigen Kontrolle der rRNA Synthese spielt die reversible

Phosphorylierung von TIF-IA. Unter veränderten Wachstumsbedingungen wird TIF-IA an spezifischen Serinresten von Proteinkinasen phosphoryliert bzw. von Phosphatasen dephosphoryliert. Obwohl die wachstumsabhängige Kontrolle der TIF-IA Aktivität bereits gut verstanden ist, bleibt unklar, ob und inwieweit TIF-IA auch im Rahmen des Pol I Transkriptionszyklus durch reversible Phosphorylierungen reguliert wird.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von TIF-IA im Transkriptionsprozeß aufzuklären. Insbesondere sollte untersucht werden, ob für die Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes eine Interaktion von TIF-IA mit dem *core promoter element* notwendig ist. Ein direkter Kontakt zwischen TIF-IA und Promotor wurde in Betracht gezogen, da eine Mutation des Guanins an Position -7 (G-7) im *core promoter element* keinen Effekt auf Bindung von TIF-IB hat, die Transkriptionsaktivität jedoch stark hemmt. Die funktionelle Analyse einer rDNA-Matrize mit einer G-7→A Transition sollte mit folgenden *in vitro* Transkriptionsexperimente durchgeführt werden:

- (i) Transkriptionsanalysen mit immobilisierten rDNA-Matrizen. Mit diesen Experimenten sollten die an Wildtyp- und mutierten Promotoren gebundenen Prä-Initiationskomplexe isoliert und funktionell charakterisiert werden.
- (ii) Inhibierung der Transkription durch Depletierung der TIF-IA Aktivität. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit Transkription an der G-7 Promotor-Mutante von TIF-IA abhängt.
- (iii) *single round*- und abortive Transkriptionsexperimente. Durch Inhibierung von Re-Initiation und produktiver Elongation sollte der Schritt der Pol I Transkription, an dem das Guanin an Position -7 beteiligt ist, identifiziert werden.

Bei der Frage, ob TIF-IA einer transkriptionsgekoppelten Regulation unterliegt, sollte die funktionelle Relevanz der Phosphorylierung von Serin 170 und 172 in TIF-IA untersucht werden. Hierfür sollte eine nicht-phosphorylierbare TIF-IA-Mutante (TIF-IAS170A/S172A) hergestellt werden, um folgende Analysen durchzuführen:

- (i) Identifizierung der Kinase, die Serin 170 und 172 in TIF-IA phosphoryliert. Da beide Serine in einer CK2-Konsensus-Sequenz liegen, sollte die *in vitro* Phosphorylierung von Wildtyp-TIF-IA und TIF-IAS170A/S172A durch CK2 getestet werden. Des Weiteren sollte durch Phospho-Peptid-Analysen von TIF-IA und TIF-IAS170A/S172A die *in vivo* Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2 nachgewiesen werden.

- (ii) Funktionelle Charakterisierung von TIF-IAS170A/S172A. Die transkriptionelle Aktivität der Mutante sollte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Durch Expression von TIF-IAS170A/S172A in *TIF-IA knockout* Zellen sollte darüber hinaus eine weitergehende Charakterisierung der Funktion von TIF-IA in Abhängigkeit von CK2-abhängiger Phosphorylierung erfolgen.
- (iii) Untersuchung der Interaktion von Wildtyp- und mutiertem TIF-IA mit anderen Faktoren des Prä-Initiationskomplexes. Hierfür sollten Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt werden, die zeigen, ob die Mutation von Serin 170 und 172 Auswirkungen auf die Bindung von TIF-IA an TIF-IB oder Pol I hat.

Neben der Analyse von TIF-IAS170A/S172A sollte die CK2-abhängige Phosphorylierung von TIF-IA auch mit Hilfe von spezifischen CK2-Inhibitoren untersucht werden. Es sollten Transkriptionsanalysen und Interaktionsstudien mit rekombinantem und endogenem TIF-IA nach Inhibierung von CK2 durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte ein Antiserum hergestellt werden, das spezifisch Phospho-Serin 170 und 172 in TIF-IA erkennt. Mit diesen Antikörpern sollte der Phosphorylierungsstatus von Serin 170 und 172 in freiem und Pol I-gebundenem TIF-IA bestimmt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den gängigen Anbietern für molekularbiologische Produkte wie Sigma-Aldrich, BioRad, Promega, New England Biolabs, u.a. bezogen. Die CK2-Inhibitoren 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) und 2-Dimethylamino-TBB (DMAT) wurden von der Firma Calbiochem (Merk Bioscience) bezogen.

3.1.2 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für die Mutagenese von TIF-IA und für die Analyse des *TIF-IA*-Gens bzw. der TIF-IA mRNA in Maus-Zellen verwendet:

S170Afor:

5'-GGAAGGCGATGTAGATGTGGCCGATTCTGATGATGAAGATGATAATC-3'

TIF-IAS170Arev:

5'-GATTATCATCTTCATCATCAGAATCGGCCACATCTACATCGCCTTCC-3'

S172Afor:

5'-GGAAGGCGATGTAGATGTTTCAGACGCGGATGATGAAGATGATAATC-3'

S172Arev:

5'-GATTATCATCTTCATCATCCGCGTCTGAAACATCTACATCGCCTTCC-3'

S170A/S172Afor: 5'-GATGTAGATGTTGCAGATGCGGATGATGAAGAT-3'

S170A/S172Arev: 5'-ATCTTCATCATCCGCATCTGCAACATCTACATC-3'

In11for: 5'-GTCCTGCTTACACTAGAGATGTGGTCCACAG-3'

Ex14for: 5'-GAACCCACTGAAGATCTGCCTGCCGCAAGTGG-3'

Ex15rev: 5'-GGAGTCTCCACCAGCGGTGCTGCGGATAACG-3'

Ex15for: 5'-CGTTATCCGCAGCACCGCTGGTGGAGACTCC-3'

Ex16rev: 5'-CTTAAACTCCTGAAGCTCTTCAGCACTCCCATC-3'

3.1.3 Plasmide

Folgende Plasmide wurde in dieser Arbeit hergestellt bzw. verwendet,

- (i) als rDNA-Matrizen in der *in vitro* Transkription:
pMr600: enthält ein Fragment der Maus-rDNA von -325 bis +292 in pUC9
pMrWT: enthält ein Fragment der Maus-rDNA von -170 bis +155 in pUC9 (Skinner et al., 1984)
pMrG-7: pMrWT-Derivat mit G→A Transition an Position -7 (Clos et al., 1986b)
pMrG-15/16: pMrWT-Derivat mit G→A Transition an Position -15 und -16
pMrG-16/25: pMrWT-Derivat mit G→A Transition an Position -16 und -25
- (ii) als Pol I Reporter-Plasmide:
pMrWT-CAT-BH, pMrG-7-CAT-BH und pMrG-15/-16-CAT-BH: Derivate der entsprechenden pMr-CAT-Plasmide (Grummt und Skinner, 1985; Clos et al., 1986b), bei denen ein rDNA-Fragment mit den ersten beiden Terminatoren eingefügt wurde (diese Arbeit)
pHrP2-BH: enthält ein Fragment der Mensch-rDNA von -411 bis +375 sowie ein Terminator-Fragment in pUC9
pBS-hrDNA-Luc-T4: enthält ein Fragment der Mensch-rDNA von -411 bis +314, gefolgt von einem Luciferase-Gen und einem Terminator-Fragment
- (iii) für die Expression von FLAG-TIF-IA:
pcDNA3.1-3xFLAG-TIF-IAwt: Derivat von pcDNA3.1FLAG-TIF-IA (Zhao et al., 2003) in das drei FLAG-Sequenzen eingeführt wurden (diese Arbeit)
pcDNA3.1-3xFLAG-TIF-IAS170A, S172A, S170A/S172A: Derivate von pcDNA3.1-3xFLAG-TIF-IAwt (diese Arbeit)
- (iv) für retrovirale Infektion:
pBabe-3xFLAG-TIF-IAwt: Derivat von pBabe-puro4 mit eingefügter Sequenz für 3xFLAG-TIF-IAwt (diese Arbeit)
pBabe-3xFLAG-TIF-IA S170A/S172A: Derivat von pBabe-3xFLAG-TIF-IAwt (diese Arbeit)
pMSCVcre: enthält die Sequenz für die Cre-Rekombinase (Yuan et al., 2005)

3.1.4 Antikörper

Die folgenden primären Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

- (i) Antikörper gegen Pol I:
Mensch-anti-RPA194 (U. Scheer, Würzburg)
Kaninchen-anti-RPA116 (Seither und Grummt, 1996)
Kaninchen-anti-PAF53 (Seither et al., 1997)
- (ii) Antikörper gegen TIF-IB:
Kaninchen-anti-TAF₁95 (Heix et al., 1997)
- (iii) Antikörper gegen TIF-IA:
Kaninchen-anti-TIF-IA (Mayer et al., 2005)
Schaf-anti-TIF-IA (B. McStay, Dundee, UK)
Kaninchen-anti-TIF-IAPs170/pS172 (diese Arbeit)
- (iv) Antikörper gegen UBF:
Maus-anti-UBF (Firma Santa Cruz)
- (v) Antikörper gegen FLAG-Peptid:
Maus-anti-FLAG, löslich (Firma Sigma)
Maus-anti-FLAG, an Agarose-Partikel gekoppelt (Firma Sigma)

3.1.5 Standard-Lösungen

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl, pH 8,3 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
PBS-Puffer	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄
TBS(T)-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,6 150 mM NaCl (0,1% Tween 20)

SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 0,2 mM Glycin 0,1% SDS
Protein-Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl 0,2 mM Glycin 20% Methanol
AM 0-500	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 20% Glycerol 5 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 0-500 mM KCl
20xSSC	3 M NaCl 0.3 M Na-Citrat pH 7,0 mit HCl

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die folgenden Methoden wurden gemäß der Protokolle in Ausubel et al. (1989) oder Sambrook et al. (1989) oder nach Hersteller-Angaben für die verwendeten Reagenzien durchgeführt: Polymerasekettenreaktion (PCR), dideoxyNTP-vermittelte DNA-Sequenzierung, Restriktionsverdau, Ligation, Gelelektrophorese, Gelextraktion, Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren, Transformation CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli* Zellen mit Plasmiden sowie Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Mini- und Maxipräparation).

3.2.2 Gezielte PCR-Mutagenese

Zur Herstellung von Expressionsplasmiden mit mutierter TIF-IA cDNA wurden das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet. Mittels PCR mit komplementären Oligonukleotiden (siehe 3.1.2), die die entsprechenden Punktmutationen aufwiesen, wurden ausgehend von pcDNA3.1-3xFLAG-TIF-IAwt die mutierten Plasmide erzeugt. Anschließend wurde ein kurzes, die Mutationen einschließendes Fragment der TIF-IA-Sequenz mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Hind III ausgeschnitten und in den EcoR I / Hind III geschnittenen pcDNA3.1-3xFLAG-TIF-IAwt kloniert. Bei diesen Plasmiden wurde die Mutation in der TIF-IA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung nachgewiesen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zellen

HEK293T und NIH3T3 Zellen sowie Fibroblasten aus *TIF-IA^{fl/fl}*-Maus-Embryonen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, mit 4,5 g/l D-Glukose), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum und 4 mM Ultra-Glutamin sowie mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. FM3A-Zellen wurden in Suspension mit RPMI-1640 Medium (10% Kälberserum, 2 mM Ultra-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Suspensionskulturen von L1210-Zellen erhielten D-MEM (10% Pferdeserum, 2 mM Ultra-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) als Nährmedium. Zum Ablösen adhärenter Zellen von den Kulturschalen wurde eine Trypsin-EDTA Lösung (140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,56 mM Na₂HPO₄; 25 mM Tris-Base; 5 mM EDTA; 5 mM Glukose und 0,25% Trypsin) verwendet.

3.3.2 Transiente Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden 10⁶ HEK293T Zellen oder 3x10⁵ NIH3T3 Zellen pro 10 cm Kulturschale in 10 ml D-MEM ausgesät. Für die Transfektion wurden TIF-IA Expressionsplasmide und/oder Pol I Reporterplasmide mit pBlueskript auf insgesamt 20 µg DNA aufgefüllt und in 500 µl 250 mM CaCl₂-Lösung verdünnt. 500 µl 2x BBS (50 mM BES-NaOH, pH 6,85; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄) wurden tröpfchenweise zugegeben und nach 20 min Inkubation wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben. Nach 8-16 Stunden wurde das Kulturmedium gegen 10 ml frisches D-MEM ausgetauscht und die Zellen wurden in der Regel für weitere 24-36 Stunden inkubiert und dann geerntet. Für Transfektionen in 6 oder 15 cm Kulturschalen wurde die Menge an Plasmid-DNA sowie Transfektionsreagenz entsprechend angepasst.

3.3.3 Retrovirale Infektion von Maus-Fibroblasten

Für die stabile Integration von TIF-IA cDNAs (Wildtyp und Mutante) sowie für die durch die Cre-Rekombinase induzierte Deletion von endogenem TIF-IA wurden Fibroblasten aus *TIF-IA^{fl/fl}*-Maus-Embryonen (Yuan et al., 2005) mit entsprechenden Retroviren infiziert. Zur Herstellung infektiöser Virus-Partikel wurden ekotrope Phoenix Zellen (HEK293T-Derivat, das die *gag-pol*- und *env*-Gene des *Moloney Murine Leukemia Virus*, MoMLV, trägt) mit 20 µg pBabe-puro4, pBabe-FLAG-TIF-IA, pBabe-FLAG-TIF-IAS170A/S172A,

pMSCV oder pMSCVcre transient transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen 5 ml frisches D-MEM ausgetauscht und die Zellen wurden zwei weitere Tage kultiviert. Das Medium wurde filtriert (0,45 µm Polysulfon-Filter), mit 8 µg/ml Polybrene (Hexadimethrin Bromid) versetzt und zu 3×10^5 Maus-Fibroblasten pro 10 cm Kulturschale gegeben. Nach 16-24 Stunden wurde das Medium gewechselt und einen Tag später wurden infizierte Zellen mit Puromycin (1 µg/ml) oder G418 (800 µg/ml) selektioniert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zellkern-Extrakten für *in vitro* Transkription

Zellkern-Extrakte wurden nach dem Protokoll von Dignam et al. (1983) aus FM3A oder L1210 Zellen hergestellt. Die Extrakte wurden bei 4°C gegen AM100 dialysiert und anschließend aliquotiert, schock-gefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.2 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Immunpräzipitation von Proteinen wurden Zell-freie Lysate aus HEK293T und NIH3T3 Zellen hergestellt. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und in Lysis-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 1% Triton X-100; 50 mM NaF; 10 mM β-Glycerolphosphat; 10 mM K₂HPO₄, 1 mM Na-Vanadat; 1x Proteasen-Inhibitor-Mix von Roche) resuspendiert. Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Zell-Trümmer mittels Zentrifugation für 15 min bei 13000 U/min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Immunpräzipitation verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C und mit eiskalten Lösungen und Puffern durchgeführt.

3.4.3 Immunpräzipitation

Die Zell-freien Lysate wurden mit löslichen oder an Agarose-Partikel gekoppelten Antikörpern für 2-16 Stunden bei 4°C inkubiert. Lösliche Antikörper wurden durch Zugabe von Protein A/G beschichteten Agarose-Partikeln immobilisiert. Bei Co-Immunpräzipitationen wurden die immobilisierten Immunkomplexe viermal mit 0,5 ml Lysis-Puffer gewaschen und für die Western Blot Analyse in 2x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 2% β-Mercaptoethanol; 20% Glycerol) resuspendiert. Wurde FLAG-TIF-IA für die *in vitro* Transkription immunpräzipitiert, wurde einmal mit Lysis-Puffer, dreimal mit AM 500 und einmal mit AM 100 (je 1 ml) gewaschen. Die

Agarose-Partikel wurden im dreifachen Volumen AM 100 resuspendiert und direkt in der *in vitro* Transkription eingesetzt oder für die Silbergel-Analyse von FLAG-TIF-IA mit einem Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Elution von FLAG-TIF-IA von den Agarose-Partikeln wurde der Immunpräzipitationsansatz in AM 200 mit 0,1% Triton X-100 und 200 ng/µl Dreifach-FLAG-Peptid inkubiert.

3.4.4 Immunfluoreszenz

Fibroblasten aus *TIF-IA^{fl/fl}*-Maus-Embryonen (Yuan et al., 2005) wurden auf Deckgläschen kultiviert und 6 Tage nach Cre-induzierter Deletion von endogenem TIF-IA für die Immunfluoreszenz präpariert. Die Deckgläschen wurden in PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellen 3 min bei RT in PB-Puffer (20 mM Tris HCl pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 0,01% Triton X-100; 25% Glyzerin) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 6 min bei -20°C und für 1 min in eiskaltem Aceton fixiert. Die Zellen wurden 3x für 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper in PBS/0,2% BSA 1 Stunde bei 37°C oder bei 4°C ü/N inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 5 min in PBS entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei RT im Dunkeln. Die Deckgläschen wurden einmal in PBS gewaschen bevor die DNA der Zellen mit Hoechst 33258 (1:200 in PBS) für 5 min gefärbt wurden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit H₂O gewaschen, um Salzreste zu entfernen und schließlich auf Objektträgern mit 3 µl Fluoromount G (SouthernBiotech) fixiert. Die Präparate wurden mit einem Axiophot Mikroskop (Zeiss) mikroskopiert und mit der Software Luria Image (Kodak) ausgewertet.

3.4.5 Western Blot

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden Zell-freie Lysate oder Immunkomplexe in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell) in Protein-Transfer-Puffer im Semi-Dry Verfahren (16 Volt; 60 min) transferiert. Die Proteine wurde anschließend mit 0,5% Ponceau S (in 3% Trichloressigsäure) auf der Membran gefärbt und in H₂O entfärbt. Die Membran wurde für 60 min in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBST) geschwenkt und über Nacht mit dem Antigen-spezifischen, primären Antikörper (in Blockierungspuffer) bei 4°C inkubiert. Es folgten 4 Waschschrte für je 10 min in TBST und eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt an Meerrettich Peroxidase) in Blockierungspuffer für 1

Stunde bei RT. Nach viermaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion durch Zugabe von Luminol (Enhanced Chemi-Luminescence Reagenz von Amersham Biosciences) mit Hilfe des LAS3000 Kamera-systems und der Software ImageGauge bzw. AIDA.

3.4.6 Proteinfärbung mit Silber

Für die semi-quantitative Analyse von immunpräzipitiertem TIF-IA wurden die Immunkomplexe zusammen mit definierten Mengen an Rinderserum-Albumin (BSA) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Silber gefärbt. Zur Fixierung wurde das Gel 1 Stunde in Fixierungslösung (30% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert und anschließend 3 x 10 min mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 1 min in 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung inkubiert, kurz gewaschen und dann in Silber-Lösung (0,2% (w/v) AgNO_3 ; 0,075% (v/v) Formaldehyd) für 10 min gefärbt. Nach erneutem kurzem Waschen wurde die Färbung bis zur gewünschten Intensität in Carbonat-Lösung (2% (w/v) Na_2CO_3 ; 0,4% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05% (v/v) Formaldehyd) entwickelt. Die Reaktion wurde durch Inkubation des Gels in Fixierungslösung gestoppt.

3.4.7 Herstellung und Reinigung von Phospho-spezifischen Antikörpern

Um Antikörper, die spezifisch die phosphorylierten Serine 170 und 172 in TIF-IA erkennen, zu erhalten, wurde von der Firma Peptide-Specialty-Laboratories (Heidelberg) ein Peptid mit der Sequenz VDVpSDpSDDEC, das den Aminosäuren 167-175 in TIF-IA entspricht und in dem die beiden Serine phosphoryliert vorliegen (pS), hergestellt. Das Peptid wurde an ein Trägerprotein (KLH) gekoppelt und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Zur Reinigung der Phospho-spezifischen Antikörper wurde das Antiserum zunächst mit einem Volumen TBS verdünnt und zur Entfernung von Partikeln filtriert (Cellulose-Acetat-Filter, Porengröße 0,2 μM). Das Serum wurde auf eine Säule mit einer Agarose-Matrix (Sulfolink von der Firma Pierce), an die das unphosphorylierte Peptid (VDVSDSDDEC) gekoppelt war (2 mg/ml Matrix), gegeben. Nach 5 Durchläufen wurde das Serum auf eine Säule mit einer Agarose-Matrix, an die das phosphorylierte Peptid (VDVpSDpSDDEC) gekoppelt war (2 mg/ml Matrix), gegeben. Wiederum nach 5 Durchläufen wurde die Säule mit 10 Volumina TBS, 20 Volumina TBS mit 0,5 M NaCl und 0,2% Triton X-100 und wieder mit 10 Volumina TBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden von der Säule mit Elutionspuffer (0,15 M NaCl und 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,5) eluiert, in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen und mit 50 μl 2 M Tris-HCl pH 8,5 pro

Fraktion neutralisiert. Um die Fraktionen, die die Antikörper enthalten, zu identifizieren, wurden je 2 µl jeder Fraktion auf eine Nitrocellulose-Membran getropft, getrocknet und dann mit 0,5% Ponceau S (in 3% Trichloressigsäure) gefärbt.

3.5 Präparation und Analyse von zellulärer RNA

3.5.1 Präparation von RNA

Zur Extraktion von RNA aus Säugerzellen wurde TRIzol Reagenz von Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierte RNA wurde in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 durch Inkubation bei 56°C für 15 min gelöst. Die Konzentration von gelöster RNA wurde photometrisch bestimmt.

3.5.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde 1 µg RNA mit 4 µl 5x MoMLV-Puffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTPs, 0,2 µl RNasin (Promega), 0,5 µl Oligo dN6 (2 µg/µl von Roche) und 1 µl MoMLV Reverse Transkriptase (Applied Biosystems) in 20 µl Gesamtvolumen zunächst für 10 min bei RT und anschließend für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 5-minütige Denaturierung bei 95°C gestoppt. Um eine Kontamination der synthetisierten cDNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde parallel eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase angesetzt, die bei nachfolgenden PCR-Analysen als Negativ-Kontrolle diente.

3.5.3 Northern Blot Analyse von 45S rRNA und Reporter-Transkripten

Zum Nachweis von Transkripten mittels Northern Blot wurde 5 µg zelluläre RNA 1:1 mit RNA-Probenpuffer (0,6x MOPS-Puffer; 50% Formamid; 8% Formaldehyd; 0,05 mg/ml Ethidium Bromid) versetzt, 15 min bei 65°C denaturiert und in einem 1% Agarose-Gel in 1x MOPS elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybaid, Amersham Biosciences) in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natrium-Citrat, pH 7,0) über Nacht transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2x SSC gewaschen (5 min) und anschließend in Hybridisierungspuffer für mindestens 3 Stunden bei 68°C inkubiert. Danach wurde die spezifische radioaktiv-markierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 68°C hybridisiert. Der Hybridisierungspuffer wurde entfernt und die Membran drei- bis fünfmal für 10 min in N-Waschpuffer (0,2x SSC und 0,1% SDS)

gewaschen. Die Membran wurde in Folie eingewickelt und die Detektion und Quantifizierung der radioaktiven Signale erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImagers.

MOPS-Puffer (10x)	0,2 mM Morpholinopropansulfonsäure 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0 (mit NaOH)
Denhardt´s-Reagenz (50x)	1 g Ficoll (Type 400, Pharmacia) 1 g Polyvinylpyrrolidon 1 g BSA ad 100 ml ddH ₂ O
Hybridisierungspuffer	50 mM Mono-/Di-Na-Phosphat, pH 6,5 50% Formamid 5x Denhardt´s Reagenz 5x SSC 0,1% SDS 1 mg/ml Hefe-tRNA

3.5.4 Herstellung von ³²P-UTP markierten RNA-Sonden

Bei der Northern Blot Analyse wurden zur Detektion radioaktiv-markierte RNA-Sonden verwendet. Die Herstellung der Sonden erfolgte durch *in vitro* Transkription linearisierter Plasmide mittels T7- oder mit SP6-RNA-Polymerase. Sonden gegen Transkripte der Pol I Reporterplasmide pMrWT-CAT-BH, pMrG-7-CAT-BH, pMrG-15/-16-CAT-BH und pHr-P2-BH wurden durch Transkription von pSKCAT (Xba I) bzw. pTβUC (Nde I) hergestellt. Für die Detektion humaner 45S rRNA wurde eine zu einem 5'-ETS Abschnitt komplementäre Sonde durch Transkription von pGemHr (BamH I) hergestellt. Die *in vitro* Transkriptionsansätze (1 µl 0,2 M DTT, 4 µl 5x Transkriptions-Puffer, 2 µl eines 33 mM ATP/CTP/GTP-Mix, 1 µl RNasin (Promega), 3 µl α-³²P-UTP (10 µCi/µl) und 1 µl RNA-Polymerase in 20 µl Gesamtvolumen) wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Matrizen-DNA mit 20 *units* RNase-freier DNase I (Roche) für 15 min bei 37°C verdaut und die markierte RNA durch Zugabe von 1 µl Glykogen (10 µg/µl Roche), 40 µl 7,5 M Natriumacetat (pH 4,8) und 520 µl 100% Ethanol gefällt (20 min bei -

80°C). Die Transkripte wurden durch Zentrifugation sedimentiert, getrocknet und in 100 µl H₂O gelöst. Die Menge an inkorporiertem ³²P-UTP wurde in einem Szintillationszähler bestimmt.

3.6 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Um die Pol I Aktivität in HEK293T Zellen zu analysieren, wurde das Reporterplasmid pBS-hrDNA-Luc-T4 verwendet, von dem ein Gen für die Luciferase aus *Photinus pyralis* (*firefly*) unter Kontrolle des Pol I Promotors exprimiert wird. Zur Normalisierung der Reporter-Expression wurden die Zellen mit pBS-hrDNA-Luc-T4 und mit dem *Renilla*-Luciferase-Plasmid pRL-TK co-transfiziert. Die Lyse der Zellen sowie die Messung der Luciferase-Aktivitäten im Luminometer erfolgten unter Verwendung des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* von Promega nach Angaben des Herstellers.

3.7 *in vitro* Transkription

3.7.1 *in vitro* Transkription im Standard-System

Die Transkription an rDNA-Matrizen in einem zellfreien System (Grummt, 1981) wurde zur Analyse der TIF-IA Aktivität und der Aktivität von rDNA-Promotor-Mutanten verwendet. In einer Standard-Reaktion wurden 30-100 µg Kernextrakt-Proteine (präpariert aus FM3A- oder L1210-Zellen gemäß 3.4.1) mit 50 ng linearisierter Plasmid-DNA (pMr600/EcoR I oder pMrWT; G-7; G-15/16/Nde I) in einem Gesamt-Volumen von 25 µl unter folgenden Bedingungen bei 30°C für eine Stunde inkubiert:

- 12 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 85 mM KCl
- 5 mM MgCl₂
- 10 mM Kalium-Kreatin-Phosphat
- 12% Glycerol
- 0,12 mM EDTA
- 0,66 mM je ATP, CTP und GTP
- 0,01 mM UTP
- 1 µCi α-³²P-UTP

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Stop-Puffer (2% (w/v) SDS; 0,02 M EDTA; 0,5 mg/ml Hefe-tRNA; 0,4 mg/ml Proteinase K) beendet und für 20 min bei 45°C inkubiert. Zur Fällung der Transkripte wurde der Ansatz mit 25 µl NH₄-Acetat

und 300 µl 100% Ethanol versetzt und für 20 min auf Eis gestellt. Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 13000 U/min sedimentiert, an der Luft getrocknet und in 10 µl 80% Formamid gelöst. Die Analyse der Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Trennung in einem Polyacrylamid-Gel (4,5%) mit Hilfe eines PhosphorImagers.

Für die *single round*-Transkription wurden Doppel-Ansätze der Standard-Transkriptionsreaktion ohne Nukleotide für 20 min vorinkubiert. Ein Ansatz enthielt 0,05% Sarkosyl (Inhibierung der Transkription). Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von NTPs gestartet, wobei der andere Ansatz mit 0,05% Sarkosyl versetzt wurde (*single round*-Transkription).

3.7.2 abortive Transkriptionsanalyse

Um die Ausbildung initierter Pol I Komplexe zu testen, wurde die abortive Transkription, d.h. die Verküpfung der ersten drei Nukleotide (A, C und U) der Maus-45S rRNA *in vitro* untersucht. Standard-Transkriptionsreaktionen ohne UTP und GTP wurden für 20 min vorinkubiert. Durch Zugabe von 5 µCi α -³²P-UTP wurde die Synthese der ACU-Trimere gestartet. Nach 30 min bei 30°C wurde der Ansatz mit 5 *units* alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Promega) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl SDS-Lösung (0,5% (w/v)) zugegeben und eine Phenol-Chloroform-Reinigung durchgeführt. Der Ansatz wurde in einem Vakuum-Verdampfer getrocknet und in 10 µl 80% Formamid gelöst. Die Analyse der ACU-Trimere erfolgte nach elektrophoretischer Trennung in einem Polyacrylamid-Gel (22%) mit Hilfe eines PhosphorImagers.

3.8 Analyse der Phosphorylierung von TIF-IA

3.8.1 *in vitro* Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2

Für die *in vitro* Phosphorylierung durch CK2 wurde FLAG-TIF-IA wie für die *in vitro* Transkription immunpräzipitiert (siehe 3.4.3). Allerdings wurden bei der Zell-Lyse keine Phosphatase-Inhibitoren eingesetzt. 200 ng des immunpräzipitierten, an Agarose-Partikel gebundenen FLAG-TIF-IA wurden pro Phosphorylierungsreaktion (Gesamt-Volumen von 20 µl) unter folgenden Bedingungen inkubiert:

250 *units* rekombinante Mensch-CK2 (New England Biolabs)

1x CK2-Reaktionspuffer (New England Biolabs)

0,2 mM ATP oder GTP

2,5 $\mu\text{Ci } \gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ oder 2,5 $\mu\text{Ci } \gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-GTP}$

Nach Inkubation für 1 Stunde bei 30°C wurden die Agarose-Partikel sedimentiert und der Überstand wurde abgenommen. Durch Zugabe von 15 μl 2x SDS-Probenpuffer wurde FLAG-TIF-IA von den Agarose-Partikeln eluiert und denaturiert. Zum Nachweis der Phosphorylierung von TIF-IA erfolgte ein Western-Blot mit anschließender Autoradiographie.

3.8.2 Phospho-Peptid-Analysen

Um die *in vivo* Phosphorylierung von TIF-IA zu untersuchen, wurde FLAG-TIF-IA in HEK293T Zellen überexprimiert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für eine Stunde in Phosphat-freiem Nährmedium mit dialysiertem fötalem Kälberserum inkubiert. Es wurden 0,4 mCi/ml ^{32}P -Orthophosphat zugegeben und für weitere 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in modifiziertem RIPA-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 10 mM β -Glycerolphosphat; 10 mM K_2HPO_4 , 1 mM Na-Vanadat; 1x Proteasen-Inhibitor-Mix von Roche) aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Zentrifugation von Zell-Trümmern geklärt und FLAG-TIF-IA wurde immunpräzipitiert (siehe 3.4.3). Der präzipitierte FLAG-TIF-IA wurde in 2x SDS-Probenpuffer gelöst, im Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und durch Autoradiographie detektiert. Der TIF-IA enthaltende Bereich der Membran wurde ausgeschnitten und TIF-IA wurde über Nacht mit 5 μg Trypsin (Promega, Sequenzier-Qualität) in 50 mM Ammonium-Bicarbonat verdaut. Durch fünfmaliges Eintrocknen im Vakuum-Verdampfer und anschließendem Lösen in zweifachdestilliertem Wasser wurde das Ammonium-Bicarbonat entfernt. Die Radioaktivität des Peptid-Gemisches wurde in einem Szintillationszähler bestimmt und ein 5000 cpm (*counts per minute*) entsprechendes Aliquot wurde auf eine Cellulose-beschichtete Glasplatte aufgetragen. Die Auftrennung der Peptide erfolgte in der ersten Dimension durch Elektrophorese bei 1000V für 22 min in 1% Ammonium-Carbonat-Puffer (pH 8,9). Anschließend erfolgte die Auftrennung in der zweiten Dimension mittels Dünnschicht-Chromatographie in einem Puffer mit 62,5% Iso-buttersäure, 1,9% n-Butanol, 4,8% Pyridin und 2,9% Essigsäure (alle Angaben v/v). Die radioaktiv markierten Phospho-Peptide wurden mit Hilfe eines PhosphorImagers detektiert.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Funktion der proximalen Promotor-Domäne bei der Initiation der Pol I Transkription

Das *core promoter element* (CPE) des Maus-rDNA-Promotors läßt sich funktionell in eine distale (Position -22 bis -16) und proximale (Position -15 bis -1) Domäne gliedern (Clos et al., 1986b; Nagamine et al., 1987; vgl. Abb. 4.1A). Während die distale Domäne, insbesondere die Guanin-Base an Position -16 für die Bindung von TIF-IB notwendig ist (Clos et al., 1986a+b; Bell et al., 1990), ist die Funktion der proximalen Domäne nicht bekannt. Da aber Mutationen an Position -7 und -1 die transkriptionelle Aktivität stark vermindern (Clos et al., 1986b; Nagamine et al., 1987), scheint auch die proximale Domäne eine essentielle Funktion bei der Transkriptionsinitiation inne zu haben. Zur näheren Charakterisierung dieser Funktion wurden Transkriptionsanalysen mit einer rDNA-Matrize, die eine G→A Transition an Position -7 aufweist, durchgeführt.

4.1.1 Die Pol I Transkription wird durch Mutation an Position -7 *in vitro* und *in vivo* inhibiert

In einem zellfreien Transkriptionssystem ist eine rDNA-Matrize mit einer G→A Transition an Position -7 nahezu inaktiv (Clos et al., 1986b; Nagamine et al., 1987). Um zunächst die Auswirkungen der G-7 Mutation in *in vitro* Transkriptionen zu testen, wurden das Plasmid pMrWT (Skinner et al., 1984), das eine Maus-rDNA-Sequenz von -167 bis +155 enthält, sowie das entsprechende G-7→A Derivat pMrG-7 mit Nde I linearisiert und in einer *run off*-Transkriptionsreaktion eingesetzt. Zur Kontrolle wurden parallel die pMrWT-Derivate pMrG-15/16 und pMrG-16/25 transkribiert, die aufgrund der G→A Transition an Position -16 ca. 10% der transkriptionellen Aktivität des Wildtyp-Promotors aufweisen, während die Mutationen an Position -15 und -25 keine Auswirkung auf die Promotor-Aktivität haben (Clos et al., 1986b). In Abb. 4.1B ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments dargestellt. Anhand der Banden-Intensität des *run off*-Transkripts läßt sich die transkriptionelle Aktivität der Mutanten relativ zum Wildtyp-Promotor quantifizieren. In Übereinstimmung mit den zuvor publizierten Daten besaßen die G-16 Mutanten noch 11,5% (pMrG-15/-16) bzw. 8,8% (pMrG-16/-25) der Aktivität der Wildtyp-Matrize, während pMrG-7 praktisch inaktiv war, d.h. nur 1,2% der Wildtyp-Aktivität aufwies.

Um die im zellfreien Transkriptionssystem erhaltenen Resultate auch *in vivo* zu überprüfen, wurden rRNA-Reportergene mit den entsprechenden Promotor-Mutanten konstruiert. Hierfür wurden pMrWT, G-7 und G-15/-16 Derivate verwendet, die jeweils den offenen Leserahmen (ORF) für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) stromabwärts der rDNA-Sequenz enthalten (Grummt und Skinner, 1985; Clos et al., 1986b). Durch Austausch eines 3'-terminalen Abschnitts des CAT-ORFs gegen ein BamHI/Hinfl-rDNA-Fragment, das die beiden ersten Pol I Terminator-Sequenzen enthält und daher die Transkriptionstermination bewirkt, wurden die Plasmide pMrWT-CAT-BH, pMrG-7-CAT-BH und pMrG-15/-16-CAT-BH hergestellt. Diese Matrizen ermöglichen in Maus-Zellen die Synthese von ca. 650 Nukleotiden langen Pol I Transkripten, die spezifisch über die interne CAT-Sequenz nachgewiesen werden können. Bevor diese Reporter-Plasmide für *in vivo* Experimente eingesetzt wurden, wurden sie zunächst nach Linearisierung in der *run off*-Transkription getestet. In diesem *in vitro* Experiment war die Transkriptionsaktivität der drei Plasmide mit den pMr-Derivaten vergleichbar. Relativ zu pMrWT-CAT-BH wiesen pMrG-15/-16-CAT-BH und pMrG-7-CAT-BH eine Transkriptionsaktivität von 12 bzw 2% auf.

Zur Analyse der Transkriptionsrate in Maus-Zellen wurden NIH3T3 Fibroblasten mit verschiedenen Mengen der Reporterplasmide transfiziert. Die zelluläre RNA wurde nach 48 Stunden isoliert und mittels Northern Blots analysiert. Dafür wurden 10 µg RNA jeder Präparation elektrophoretisch getrennt, auf eine Nylon-Membran übertragen und die Reporter-Transkripte wurden mit einer radioaktiv-markierten, zur CAT-Sequenz komplementären Sonde detektiert. Das Autoradiogramm in Abb. 4.1C zeigt, daß die Synthese von Reporter-Transkripten mit den für die Transfektion eingesetzten Mengen an pMrWT-CAT-BH korrelierte, wobei bei der geringsten Plasmid-Menge noch kein Transkript nachzuweisen war (Bahnen 2-4). Dagegen wurde in Zellen, die mit pMrG-15/-16-CAT-BH transfiziert worden waren, erst bei der höchsten Plasmid-Menge eine nachweisbare Menge an Reporter-Transkripten synthetisiert (Bahn 7). Nach Transfektion von pMrG-7-CAT-BH war keine Synthese des Reporter-Transkripts nachzuweisen. Die Transkriptionsaktivität der Promotor-Mutanten *in vivo* ist somit mit der Promotor-Aktivität *in vitro* vergleichbar. Während in beiden Fällen die Mutation an Position -16 die Transkription deutlich vermindert, reduziert die G-7→A Transition die Transkription auf ein kaum nachweisbares Niveau.

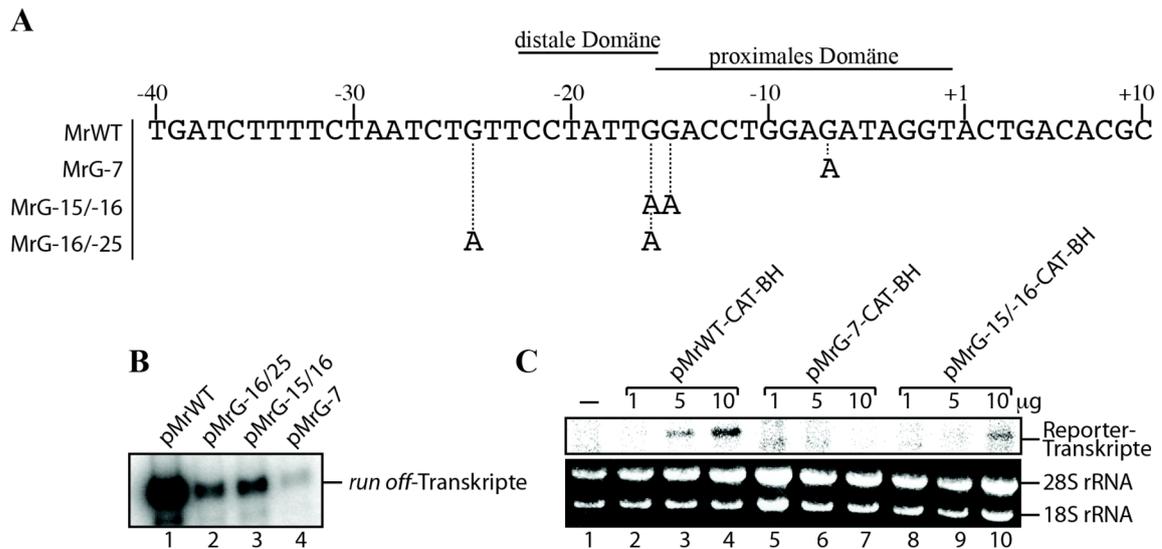


Abb. 4.1: Die G→A Transition an Position -7 des rDNA-Promotors führt zur starken Verminderung der Pol I Transkriptionsaktivität *in vivo* und *in vitro*.

(A) Übersicht über die Sequenz des *core promoter* Elements. Die Bereiche der distalen und proximalen Domäne sowie die Positionen der G→A Transitionen in den verwendeten Matrizen sind eingezeichnet.

(B) Analyse von Wildtyp- und mutierten Matrizen in einem zellfreien Transkriptionssystem. 50 ng der angegebenen, mit Nde I linearisierten Matrizen wurden mit Kernextrakt aus L1210 Zellen in Standard-Transkriptionsansätzen inkubiert.

(C) Analyse der Expression von rRNA-Reportergenen mit Wildtyp- oder mutiertem Promotor in Maus-Zellen. NIH3T3 Zellen wurden mit 1, 5 oder 10 µg der angegebenen Reporter-Plasmide transfiziert und die akkumulierten Reporter-Transkripte wurden im Northern Blot detektiert. Als Kontrolle, daß in jedem Ansatz vergleichbare Mengen an Gesamt-RNA geladen wurden, ist die mit Ethidium-Bromid-gefärbte 28S und 18S rRNA gezeigt.

4.1.2 Die Bindung eines transient mit dem Promotor assoziierten Faktors wird durch die G-7 Mutation beeinträchtigt

Wird eine sättigende Menge einer rDNA-Matrize mit einem Zellkernextrakt vorinkubiert, werden Prä-Initiationskomplexe an dieser Matrize ausgebildet und eine nachträglich zugegebene rDNA-Matrize kann aufgrund des Mangels an freien Faktoren nicht mehr transkribiert werden (Wandelt und Grummt, 1983). Mit solchen „Matrizen-Ausschluß“-Experimenten konnten Clos et al. (1986b) zeigen, daß an pMrG-7 noch teilweise Komplexe ausgebildet werden können und somit die Transkriptionsaktivität einer nachträglich zugegebenen Wildtyp-Promotor-Matrize um ca. 30% gesenkt wird. Neben der Fähigkeit, stabile Komplexe auszubilden, ist bei der G-7 Promotor-Mutante ebenfalls die Bindung von TIF-IB zumindest in Exonuklease III und DNase I Schutzexperimenten nicht beeinträchtigt (Clos et al., 1986a+b; Bell et al., 1990).

Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob die G-7 Mutation möglicherweise die Bindung eines Faktors, der nur transient mit dem Promotor assoziiert ist, beeinträchtigt. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Transkriptionsexperimente mit

immobilisierten rDNA-Matrizen durchgeführt. Diese Versuchsstrategie diente dazu, zwischen Vorinkubation mit Kernextrakt und Start der Transkription transient gebundene Faktoren durch einen Waschschrift zu entfernen. Die Herstellung der immobilisierten rDNA-Matrizen erfolgte durch PCR-Amplifikation der in pMrWT, pMrG-7 und pMrG-16/-25 enthaltenen rDNA-Fragmente in Gegenwart eines Biotin-markierten Oligonukleotides und anschließender Kopplung der biotinylierten PCR-Produkte an Streptavidin beschichtete, magnetische Partikel. Für die Transkriptionsanalyse wurden die Partikel-gebundenen rDNA-Matrizen entweder in Abwesenheit von Nucleosid-Triphosphaten mit Kernextrakt vorinkubiert, oder nach Vorinkubation mit Hilfe eines Magneten konzentriert und mit Transkriptionspuffer gewaschen (siehe Abb. 4.2A). Anschließend wurden durch Zugabe von Nucleosid-Triphosphaten die Transkriptionsreaktionen gestartet. Wie in der Abb. 4.2B dargestellt ist, waren die immobilisierten Matrizen in der Abstufung der Transkriptionsaktivität (WT > G-16 > G-7) mit den linearisierten pMr-Derivaten vergleichbar (Bahnen 1, 3 und 5). Durch den Waschschrift wurde die Transkription von MrWT und MrG-16/-25 deutlich vermindert (Bahnen 2 und 4), was für den partiellen Verlust von mindestens einem essentiellen Faktor spricht. Dagegen hatte bei der G-7 Mutante der Waschschrift keinen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität (Bahn 6). Hieraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die geringe Promotor-Aktivität der G-7 Mutante aus einer verminderten Bindung eines transient mit dem Promotor assoziierten Faktors resultiert.

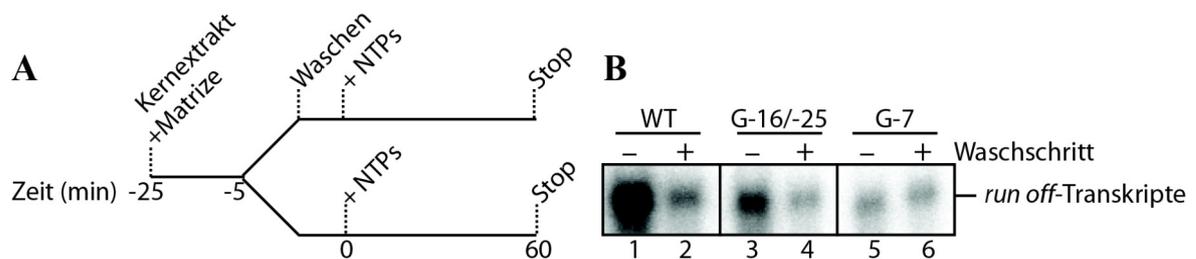


Abb. 4.2: Die Transkriptionsaktivität der G-7 Mutante wird nicht durch Waschen der Promotor-gebundenen Komplexe verringert.

Kernextrakt aus L1210-Zellen wurde mit immobilisierten Matrizen 20 min vorinkubiert. Danach blieben die Ansätze unbehandelt oder die Matrizen-gebundenen Prä-Initiationskomplexe wurden mit Transkriptionspuffer gewaschen. Durch Zugabe von Nucleosid-Triphosphaten (NTPs) wurden die Reaktionen gestartet und für weitere 60 min inkubiert.

(A) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.

(B) Vergleich der transkriptionellen Aktivität der unbehandelten oder gewaschenen Matrizen.

4.1.3 Die transkriptionelle Aktivität der G-7 Promotor-Mutante ist von TIF-IA abhängig

Die in Abb. 4.2B gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, daß die G→A Transition an Position -7 die Bindung eines Faktors, der nur teilweise stabil mit dem Prä-Initiationskomplex assoziiert, aber essentiell für die Transkription ist, beeinträchtigt. Ein Faktor, der dieses Kriterium erfüllt ist TIF-IA. Schnapp et al. (1993) konnten zeigen, daß nach Inkubation einer rDNA-Matrize mit Kernextrakt, dem die TIF-IA Aktivität fehlt, Prä-Initiationskomplexe ausgebildet werden können. Die Fähigkeit, die Transkription zu initiieren, erhalten diese Komplexe allerdings erst nach Zugabe von aktivem TIF-IA. Folglich ist TIF-IA im Gegensatz zu TIF-IB nicht stabil mit dem rDNA-Promotor assoziiert. Um der Frage nachzugehen, ob die reduzierte Transkriptionsaktivität der G-7 Promotor-Mutante aus einer verminderten TIF-IA Assoziation resultiert, sollte zunächst untersucht werden, inwieweit die Transkription der pMrG-7 Matrize von TIF-IA abhängt. Zu diesem Zweck wurden *run off*-Transkriptionen mit pMrWT, pMrG-7 und pMrG-15/-16 unter Verwendung eines Kernextrakts aus Rapamycin-behandelten Zellen durchgeführt. Da Rapamycin zu einer Inaktivierung von TIF-IA führt (Mayer et al., 2004), war der Kernextrakt transkriptionell inaktiv. Daher erfolgte an den Matrizen mit Wildtyp- und G-15/-16 Promotor keine Transkription (Abb. 4.3A, Bahnen 4 und 5). Bei der G-7 Mutante waren ebenfalls keine Transkripte detektierbar (Bahn 6), so daß folglich die geringe Rest-Aktivität, die an pMrG-7 nachweisbar ist, von der TIF-IA Aktivität abhängt. In der Tat konnte durch die Zugabe einer Fraktion mit partiell gereinigtem TIF-IA die Transkription aller drei Matrizen stimuliert werden, wobei jeweils ein Niveau erreicht wurde, das der Transkription mit einem aktiven Kernextrakt entsprach (vgl. Abb. 4.3A, Bahnen 1-3 mit Abb. 4.1B).

Da die transkriptionelle Rest-Aktivität der G-7 Promotor-Mutante von funktionell aktivem TIF-IA abhängt, sollte untersucht werden, ob sich die Transkription an Wildtyp- und mutierter Promotor in ihrem Bedarf an TIF-IA unterscheidet. Es ist denkbar, daß sich eine möglicherweise verminderte TIF-IA Bindungskapazität nicht nur in der beeinträchtigten Transkriptionsaktivität sondern auch in einer erhöhten Sensitivität gegenüber einer Verringerung der TIF-IA Konzentration widerspiegelt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden *in vitro* Transkriptionen mit linearisiertem pMrWT und pMrG-7 durchgeführt, bei denen transkriptionell aktiver TIF-IA durch Vorinkubation des Kernextrakts mit anti-TIF-IA Antikörpern inhibiert wurde. Wie in Abb. 4.3B gezeigt, wurde die Transkription der Wildtyp-Matrize durch anti-TIF-IA Antikörper stark

gehemmt. Diese Hemmung korrelierte mit der Antikörper-Menge (untere Reihe, Bahnen 3 und 4) und war spezifisch, da der Antikörper nach Hitze-Denaturierung keinen inhibitorischen Effekt hatte (untere Reihe, Bahn 5). Vergleichbar zu pMrWT wurde auch die Transkription an der G-7 Mutante durch den anti-TIF-IA Antikörper Dosis-abhängig und spezifisch gehemmt (untere Reihe, Bahnen 3 bis 4). In Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Experiment (siehe Abb. 4.3A), wird hierdurch die Notwendigkeit von TIF-IA für die Transkription der pMrG-7 Promotor-Mutante belegt. Da die Transkriptionsaktivität des Wildtyp-Promotors und der G-7 Mutante in gleicher Weise durch den Antikörper reduziert wurde, ist zudem die Abhängigkeit von TIF-IA in beiden Fällen ähnlich. TIF-IA wird also für die Transkription an pMrG-7 genauso benötigt wie für die Transkription an einer Wildtyp-Matrize.

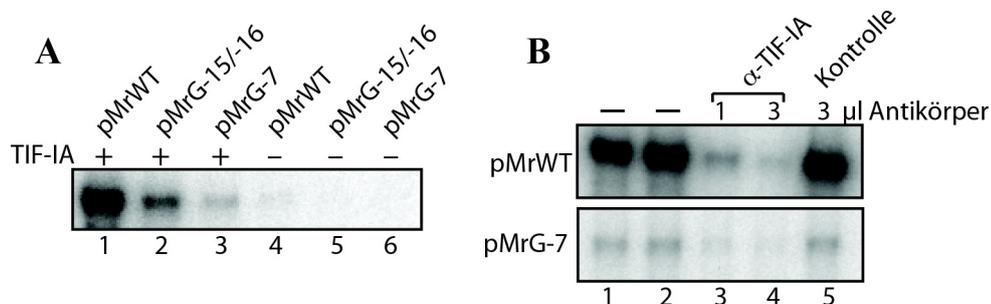


Abb. 4.3: Für die Transkription der G-7 Promotor-Mutante wird TIF-IA benötigt.

(A) Analyse der Transkription in An- oder Abwesenheit von TIF-IA. 50 ng der mit NdeI linearisierten rDNA-Matrizen wurden mit Kernextrakt aus Rapamycin-behandelten L1210 Zellen in Standard-Transkriptionsansätzen inkubiert. Die in den Bahnen 1 bis 3 aufgetragenen Reaktionen enthielten zusätzlich eine Fraktion mit partiell gereinigtem TIF-IA.

(B) Inhibition der Transkription von pMrWT und pMr-7 durch anti-TIF-IA Antikörper. 50 µg Protein aus L1210-Kernextrakt wurde 15 min mit Puffer (Bahnen 1, 2, 6 und 7) oder mit ansteigenden Mengen von affinitätsgereinigten anti-TIF-IA Antikörpern (Bahnen 3, 4, 8 und 9) oder mit Hitze-inaktivierten anti-TIF-IA Antikörpern (Bahnen 5 und 10) vorinkubiert. Anschließend wurde die Transkription durch Zugabe von Matrize und NTPs gestartet.

4.1.4 Die Re-Initiation der Pol I Transkription wird durch die G-7 Mutation nicht beeinträchtigt

Für die bisher durchgeführten Transkriptionsanalysen wurde ein System verwendet, das die Summe aller Transkriptionszyklen, die in einer bestimmten Reaktionszeit durchlaufen werden, mißt. Unter diesen Versuchsbedingungen wird die Transkriptionsrate überwiegend durch die Re-Initiationseffizienz bestimmt (Panov et al., 2001). Da für TIF-IA eine transkriptionsgekoppelte Inaktivierung beschrieben wurde (Hirschler-Laszkiewicz

et al., 2003), ist davon auszugehen, daß die Re-Initiation zum Teil von der Effizienz, mit der Pol I wieder in eine initiationskompetente Form überführt wird, abhängt. Vermutlich sind an diesem *Recycling*-Vorgang Enzyme beteiligt, deren Rekrutierung im Rahmen der Prä-Initiationskomplex-Bildung erfolgt (Panova et al., 2006). Folglich konnte als Ursache für die verminderte Transkriptionsaktivität der pMrG-7 Matrize auch eine Inhibition der Re-Initiation, die möglicherweise durch eine beeinträchtigte Rekrutierung von „*recycling*-Faktoren“ verursacht wird, in Betracht gezogen werden.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde im folgenden Experiment durch Verwendung von Sarkosyl die Transkription auf einen Zyklus limitiert. Das Detergenz Sarkosyl wurde bereits für die Entkopplung und Analyse verschiedener Schritte der Transkriptionsinitiation von Pol II und III eingesetzt (Hawley und Roeder, 1985; Kovelman und Roeder, 1990). Die Bildung des Pol I Initiationskomplexes wird durch eine Sarkosyl-Konzentration von ca. 0,05% gehemmt, während der ausgebildete Komplex resistent gegen diese Konzentration ist (Schnapp et al., 1993). Daher kann in einem Transkriptionsansatz nach Bildung der Prä-Initiationskomplexe und anschließender Zugabe von Sarkosyl die Transkriptionsinitiation erfolgen, die Re-Initiation weiterer Transkriptionszyklen wird aber unterbunden. Zur Analyse der durch Sarkosyl limitierten *single round*-Transkription wurden pMrWT, pMrG-15/-16 und pMrG-7 in Gegenwart von 0,05% Sarkosyl transkribiert, wobei die Zugabe direkt in den Reaktionsansatz oder nach Vorinkubation von Matrize und Kernextrakt erfolgte (Abb. 4.4A). Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind in Abb. 4.4B dargestellt. Während in der Serie ohne Sarkosyl die Matrizen jeweils die für die *multiple round* Transkription erwartete Aktivität aufwiesen (obere Reihe; vgl. Abb. 4.1B) wurde durch die direkte Zugabe von Sarkosyl die Transkription bei allen drei Matrizen komplett inhibiert (untere Reihe). Wurde Sarkosyl nach der Vorinkubation ergänzt, verringerte sich bei pMrWT und bei pMr-G15/-16 deutlich die Menge an Transkripten. Im Vergleich zu den unbehandelten Reaktionen veränderten sich die relative Transkriptionsaktivitäten der beiden Matrizen zueinander nicht (mittlere Reihe). Interessanterweise wurde die geringe transkriptionelle Aktivität von pMrG-7 durch die *single round*-Bedingungen ebenfalls noch weiter reduziert (vgl. Bahn 3, obere und mittlere Reihe). Folglich beeinträchtigt die G-7 Mutation nicht spezifisch die Re-Initiation, sondern hat einen generellen Effekt auf die Pol I Initiation.

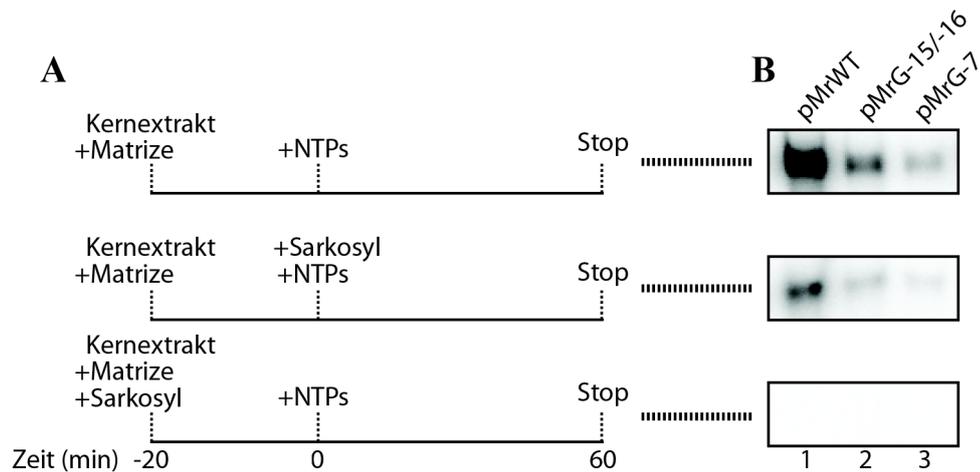


Abb. 4.4: Die Re-Initiation der Transkription wird durch die G→A Transition an Position -7 nicht gehemmt.

Standard-Transkriptionsansätze (vgl. Abb 4.1B) wurden für 20 min vorinkubiert, wobei eine Ansatz-Serie zusätzlich 0,05% Sarkosyl enthielt (untere Reihe). Anschließend wurden die Transkription durch Zugabe von NTPs gestartet und für weitere 60 min inkubiert. Eine Serie wurde zusätzlich mit 0,05% Sarkosyl versetzt (mittlere Reihe).

(A) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.

(B) Analyse der unter den verschiedenen Bedingungen synthetisierten Transkripte.

4.1.5 Die G-7 Promotor-Mutante ist in einem frühen Schritt der Initiation beeinträchtigt

Da gemäß dem vorhergehenden Experiment die Transkription der G-7 Promotor-Mutante in der Initiationsphase beeinträchtigt ist, sollte im folgenden die Funktion des Guanins an Position -7 bei der Transkriptionsinitiation eingegrenzt werden. Um zu untersuchen, ob an der G-7 Promotor-Mutante ein Schritt vor oder nach der Knüpfung der ersten Phosphodiester-Bindungen inhibiert ist, wurde eine abortive Transkriptionsanalyse durchgeführt. Hierbei macht man sich zunutze, daß RNA-Polymerasen nach der Transkriptionsinitiation erst mehrerer kurzer, abortiver Transkriptionszyklen durchlaufen, bevor sie in eine produktive Elongationsphase übergehen (McClure et al., 1978; Luse und Jacob, 1987; Kassavetis et al., 1992). Experimentell läßt sich die abortive Pol I Transkription *in vitro* nachweisen, indem man die Transkriptionsreaktion nur mit den ersten drei Nukleotiden der 45S rRNA (ATP, CTP und UTP, vgl. Abb. 4.1A) supplementiert (siehe Abb. 4.5A). Hierdurch werden ACU-Trimere synthetisiert, ohne daß Pol I den Promotor verläßt (Schnapp et al., 1993). In der abortive Transkription waren pMrG-15/-16 und pMrG-7 im Vergleich zu pMrWT ähnlich stark wie unter Normalbedingungen beeinträchtigt (Abb. 4.5B). Während bei pMrG-15/-16 deutlich weniger Trimer als bei pMrWT synthetisiert wurden, waren bei pMrG-7 kaum Trimer

nachweisbar. Demnach ist die Aktivität aller drei Matrizen in der abortiven Transkription mit der Aktivität unter *run off* Bedingungen vergleichbar. Hieraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß das Guanin an Position -7 des rDNA-Promotors essentiell für die Synthese der ersten Phosphodiester-Bindungen ist.

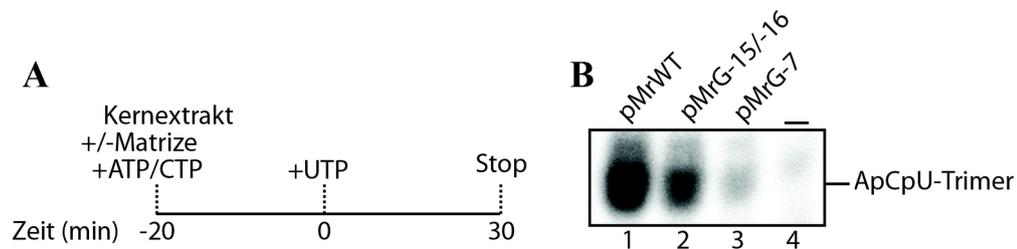


Abb. 4.5: Die G-7 Promotor-Mutante ist in der frühen Transkriptionsinitiation beeinträchtigt.

In einer abortiven Transkriptionsanalyse wurden die Matrizen mit über DEAE-Sepharose gereinigtem Kernextrakt aus FM3A-Zellen sowie mit ATP und CTP 20 min vorinkubiert. Durch Zugabe von α - 32 P-UTP wurde die Trimer-Synthese gestartet. Nach 30 min wurden die Reaktionen gestoppt, mit alkalischer Phosphatase behandelt und die Trimere wurden von den Mono-Nukleotiden in einem 22%igem Polyacrylamid-Gel getrennt.

(A) Schema des Versuchsablaufs.

(B) Analyse der Trimer-Synthese. Als Kontrolle für die Abhängigkeit der abortiven Transkription von den rDNA-Matrizen diente ein Matrizen-freier Ansatz (Bahn 4).

4.2 Regulation der Pol I Transkription durch CK2-abhängige Phosphorylierung von TIF-IA

In Säugerzellen ist die Proteinkinase CK2 mit dem Pol I Holoenzym assoziiert und an der Regulation der 45S rRNA Synthese beteiligt. Mit UBF und TAF₁₁₀ wurden bisher zwei Komponenten des basalen Pol I Transkriptionsapparates als CK2-Substrate identifiziert (Voit et al., 1992; Voit et al., 1995; Panova et al., 2006; Lin et al., 2006). Darüber hinaus enthält TIF-IA zwei Phospho-Serine, die in einer CK2-Konsensus-Sequenz liegen (Schlosser et al., 2002). Mit den im folgenden beschriebenen Experimenten sollte die Rolle von CK2 bei der Regulation der Pol I Transkription, unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen CK2-abhängigen Phosphorylierung von TIF-IA, aufgeklärt werden.

4.2.1 CK2 ist für die 45S rRNA Synthese essentiell

Um zu untersuchen, ob die zelluläre Pol I Transkription die Aktivität von CK2 erfordert, wurde die 45S rRNA Synthese in HEK293T Zellen nach Inhibition von CK2 untersucht. Hierfür wurde das zur Gruppe der halogenierten Benzimidazole gehörende 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) verwendet, das CK2 spezifisch (K_i -Wert von 0,4 μ M) und

effektiv ($IC_{50} \approx 1-2 \mu\text{M}$) hemmt (Sarno et al., 2001). Die Zellen wurden für 2 Stunden mit TBB in verschiedenen Konzentrationen oder dem TBB-Lösungsmittel DMSO behandelt und die Synthese der 45S rRNA wurde anschließend im Northern Blot mit einer zu den ersten 155 Nukleotiden des unprozessierten Transkripts komplementären Sonde nachgewiesen. Wie die Abb. 4.6 zeigt, hatte im Vergleich zu unbehandelten Zellen die Gabe von DMSO keinen Effekt auf die Synthese der primären Pol I Transkripte (Bahnen 1 und 2). Dagegen führte die Behandlung der Zellen mit TBB konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der 45S rRNA, wobei die höhere TBB-Konzentration eine drastische Verminderung bewirkte (Bahnen 3 und 4). Dagegen hatte die Behandlung mit TBB keinen Effekt auf die Synthese bzw. der β -Aktin mRNA (Abb. 4.6, untere Reihe). Da eine Inhibierung von CK2 mit einer stark verminderten Pol I Aktivität einhergeht, kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die CK2 Aktivität essentiell für die Synthese der 45S rRNA ist.

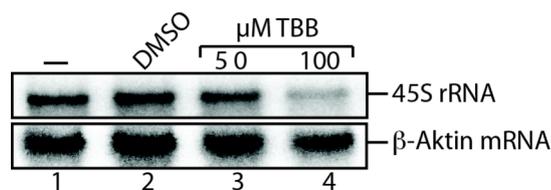


Abb. 4.6: Die zelluläre 45S rRNA Synthese wird durch Hemmung von CK2 inhibiert.

RNA aus HEK293T Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen des CK2-Inhibitors TBB oder dem Lösungsmittel DMSO für zwei Stunden behandelt wurden, wurde im Northern Blot hinsichtlich Synthese der 45S rRNA (obere Reihe) oder der β -Aktin mRNA (untere Reihe) untersucht.

4.2.2 TIF-IA wird durch Inhibition von CK2 inaktiviert

Vorhergehende Studien haben gezeigt, daß sowohl UBF als auch TIF-IB durch CK2 phosphoryliert werden (Voit et al., 1992; Voit et al., 1995; Panova et al., 2006). Daher sollte im folgenden untersucht werden, ob auch die Aktivität von TIF-IA, dem dritten basalen Faktor des Pol I Initiationskomplexes, CK2-abhängig reguliert wird. Zu diesem Zweck wurden HEK293T Zellen mit einem Expressionsplasmid für rekombinanten TIF-IA, der N-terminal mit einer „FLAG“-Peptidsequenz fusioniert ist, transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen wie unter 4.2.1 beschrieben mit TBB behandelt und anschließend wurde rekombinanter TIF-IA mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop immunpräzipitiert. Um die Aktivität von TIF-IA aus unbehandelten oder TBB-behandelten

Zellen zu analysieren, wurden *in vitro* Transkriptionsanalysen mit Kernextrakt aus wachstumsarretierten Zellen durchgeführt (Abb. 4.7). Da endogener TIF-IA in diesem Extrakt in inaktiver Form vorliegt (Buttgereit et al., 1985), ist das Ausmaß der Transkriptionsstimulation auf die Aktivität des zugegebenen TIF-IA zurückzuführen. Zur Vermeidung einer möglichen Re-Phosphorylierung von TIF-IA durch im Extrakt vorhandene CK2 erfolgten die Transkriptionsreaktionen in Gegenwart von AMP-PNP und GMP-PNP anstelle von ATP und GTP. Wie in der Abb. 4.7 dargestellt ist, wurde durch die Zugabe von TIF-IA aus unbehandelten HEK293T Zellen die transkriptionelle Aktivität des Extraktes wiederhergestellt, während ohne exogenen TIF-IA eine kaum detektierbare Transkription stattfand (Bahnen 1-3). Dabei korrelierte die Stimulation der Transkription (6- bis 8-fach) mit der eingesetzten Menge an TIF-IA (Bahnen 2 und 3). Die Supplementation der Transkription mit TIF-IA aus Zellen, die mit 50 μM TBB behandelt wurden, führte zu einer schwächeren, aber ebenfalls Mengen-abhängigen Steigerung der Transkriptionsaktivität (4- bis 6-fach; Bahnen 4 und 5). Darüber hinaus war TIF-IA, der aus mit 100 μM TBB behandelten Zellen isoliert wurde, noch weniger aktiv, so daß selbst die höhere Menge an TIF-IA die Transkription nur um das 4-fache stimulierte (Bahnen 6 und 7). Hieraus läßt sich folgern, daß die Hemmung von CK2 die TIF-IA Aktivität inhibiert. Demnach wird TIF-IA durch CK2 positiv reguliert. Allerdings kann nicht entschieden werden, ob diese Regulation direkt, also durch Phosphorylierung von TIF-IA, oder indirekt über andere CK2-Substrate, die die TIF-IA Aktivität beeinflussen, erfolgt.

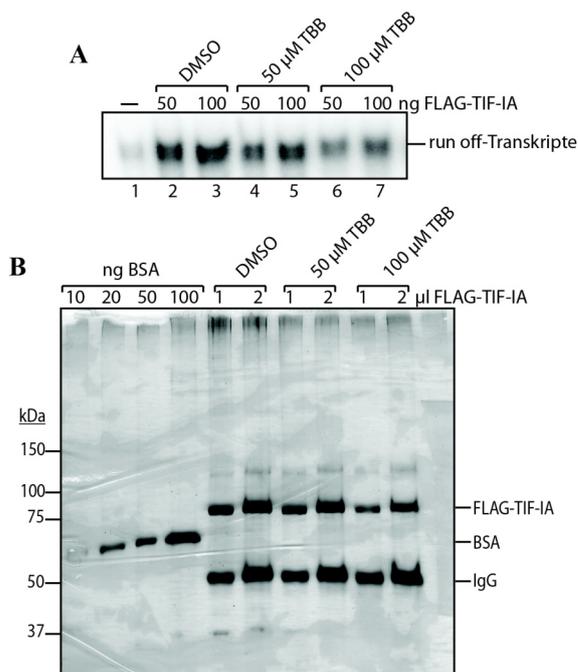


Abb. 4.7: Die Hemmung von CK2 führt zu einer verminderten TIF-IA Aktivität.

(A) Analyse der Aktivität von FLAG-TIF-IA aus HEK293T Zellen, die mit TBB oder dem Lösungsmittel DMSO für zwei Stunden behandelt wurden. Steigende Mengen jeder FLAG-TIF-IA Präparation wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die transkriptionelle Aktivität eines Kernextrakts aus Wachstums-arretierten L1210 Zellen zu komplementieren, getestet.

(B) Semi-quantitative Analyse der FLAG-TIF-IA Präparationen. Verschiedene Mengen des in der *in vitro* Transkription eingesetzten FLAG-TIF-IA wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Silber gefärbt. Zur Mengen-Abschätzung wurden parallel steigende Mengen an Rinder-Serumalbumin (BSA) aufgetragen. Die Signale auf Höhe von 50 kDa (IgG) entsprechen den in den Präparationen vorhandenen schweren Immunglobulin-Ketten der anti-FLAG Antikörper.

4.2.3 Serin 170 und 172 in TIF-IA werden durch CK2 phosphoryliert

Aufgrund der unter 4.2.2 beschriebenen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob TIF-IA durch CK2 direkt phosphoryliert wird. Um mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen in TIF-IA zu identifizieren, wurde zunächst eine die Aminosäure-Sequenz von TIF-IA mit Hilfe der Internet-Programme „NetPhos“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) und „MotifScan“ (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml) analysiert. Hierbei wurden gemäß der CK2-Konsensus-Sequenz insgesamt 7-8 Serin- bzw. Threoninreste als mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen identifiziert. Von diesen Aminosäuren wurden für Serin 170 und 172 eine hohe Wahrscheinlichkeit sowie für Threonin 292 eine mittlere Wahrscheinlichkeit berechnet, in der Tertiärstruktur von TIF-IA an der Oberfläche exponiert zu liegen. Diese drei Aminosäurereste sind demnach theoretisch für eine Phosphorylierung besonders prädestiniert. Serin 170 und 172 sind evolutionär konserviert und kommen nicht nur in TIF-IA aus Mensch und Maus sondern auch in TIF-IA-Homologen weiter entfernter Wirbeltier-Spezies wie *Xenopus* und Huhn vor (Abb. 4.8A). Dagegen ist Threonin 292 innerhalb der Säuger, nicht aber in den anderen untersuchten Wirbeltiergruppen konserviert. Darüber hinaus konnte für Serin 170 und Serin 172 bereits gezeigt werden, daß sie *in vivo* in phosphorylierter Form vorliegen (Schlosser et al., 2002).

Um zu untersuchen, ob in der Tat die Serine 170 und 172 durch CK2 phosphoryliert werden, wurden TIF-IA Mutanten hergestellt, in denen Serin 170 und/oder 172 durch gezielte Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht wurde. Auf diese Mutanten sollte die Übertragung eines Phosphatrests an der entsprechenden Position nicht mehr möglich sein. Für die Expression in Säugerzellen wurden entsprechende Plasmid-Konstrukte durch PCR-Mutagenese des FLAG-TIF-IA-Plasmids hergestellt. Die Phosphorylierung von Wildtyp-TIF-IA oder der S170A/S172A-Mutante wurde zunächst *in vitro* unter Verwendung von kommerziell erhältlicher, gereinigter CK2 untersucht. Hierfür wurden FLAG-TIF-IA oder FLAG-TIF-IAS170A/S172A in HEK293T Zellen synthetisiert und immunpräzipitiert (Abb. 4.8B). Die Phosphorylierung der gereinigten Proteine durch CK2 wurde in Gegenwart entweder von γ -³²P-ATP oder von γ -³²P-GTP durchgeführt. Da CK2 im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinkinasen ATP und GTP mit annähernd gleicher Effizienz als Phosphat-Donor verwenden kann (Pinna, 1990), wurde durch die Verwendung von γ -³²P-GTP die Spezifität der Phosphorylierungsreaktion für CK2 erhöht. Zudem wurde die CK2-spezifische Phosphorylierung von TIF-IA in Reaktionsansätzen kontrolliert, denen CK2-Inhibitoren zugegeben wurden. Hierfür wurden TBB oder 2-Dimethylamino-TBB (DMAT), das CK2 noch effektiver als TBB hemmt ($K_i \approx 0,04 \mu\text{M}$;

$IC_{50} \approx 0,15 \mu\text{M}$; Pagano et al., 2004), verwendet. Zur Analyse der *in vitro* Phosphorylierung wurden FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und die Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 4.8C). Die Übertragung von ^{32}P -Phosphat auf Wildtyp-TIF-IA erfolgte nur in Gegenwart von CK2, wobei ATP und GTP in gleicher Weise als Phosphat-Donor fungieren konnten (Bahnen 1-3). Während die Zugabe des Lösungsmittels DMSO die Phosphorylierungsreaktion nur leicht hemmte (Bahn 4), wurde durch die CK2-Inhibitoren TBB und DMAT jeweils eine starke, konzentrationsabhängige Inhibierung erzielt (Bahnen 5-8). Folglich wird TIF-IA spezifisch durch CK2 phosphoryliert. Überraschenderweise konnte FLAG-TIF-IAS170A/S172A ebenfalls durch CK2 phosphoryliert werden (Bahnen 9 und 10). Allerdings war die Effizienz der Phosphorylierungsreaktion im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich reduziert (vgl. Bahnen 3 und 10). Hieraus kann gefolgert werden, daß die CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA überwiegend an den Serinen 170 und 172 erfolgt, daß aber unter *in vitro* Bedingungen auch andere Serin- oder Threoninreste in TIF-IA durch CK2 phosphoryliert werden.

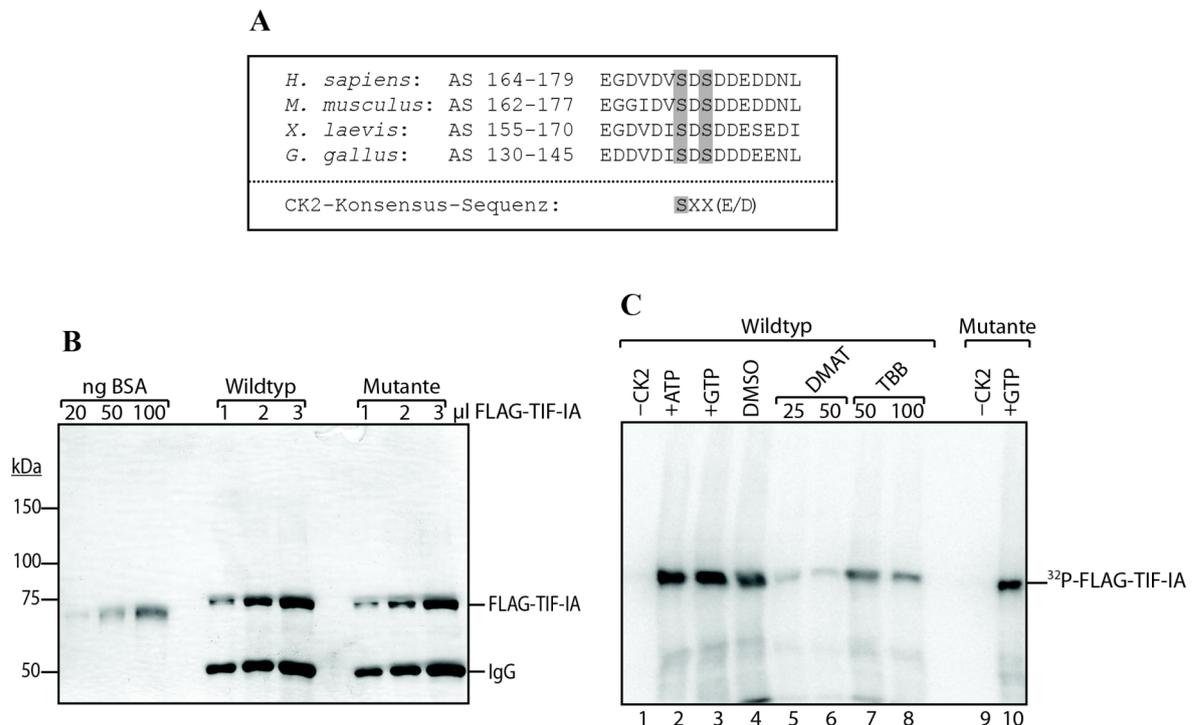


Abb. 4.8: Serin 170 und 172 in TIF-IA werden *in vitro* durch CK2 phosphoryliert.

(A) Phylogenetischer Vergleich der TIF-IA-Sequenz von Position 164 bis 179 aus Mensch (*Homo sapiens*) mit homologen Sequenzen von TIF-IA aus Maus (*Mus musculus*), Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und Huhn (*Gallus gallus*). Die Serine 170 und 172 in Mensch-TIF-IA sowie die korrespondierenden Serinreste der anderen Sequenzen sind grau unterlegt. Zum Vergleich ist ebenfalls die allgemeine CK2-Konsensus-Sequenz dargestellt.

(B) Semi-quantitative Analyse von gereinigtem FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A. Für die *in vitro* Phosphorylierung wurden FLAG-TIF-IA (Wildtyp) und FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) aus HEK293T Zellen präzipitiert. Zur Mengen-Abschätzung wurden wie in Abb. 4.7B steigende Mengen der TIF-IA Proteine sowie definierte Mengen an Rinder-Serumalbumin (BSA) in einer SDS-PAGE getrennt und mit Silber gefärbt.

(C) Die Mutation von Serin 170 und 172 verringert die *in vitro* Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2. 2 µl (ca. 200 ng) FLAG-TIF-IA (Wildtyp) oder FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) wurden in Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt. Bis auf die Ansätze 1 und 9 enthielten alle Reaktionen 250 U gereinigte CK2 (NewEngland Biolabs). Außer in Ansatz 2, bei dem γ -³²P-ATP verwendet wurde, diente γ -³²P-GTP als Phosphat-Donor. Ansätze 4-8 wurden zusätzlich mit 0,5% DMSO oder den in DMSO gelösten CK2-Inhibitoren DMAT und TBB (maximal 0,5% Volumenanteil) behandelt.

Aufgrund der *in vitro* Phosphorylierungsexperimente konnte nicht ausgeschlossen werden, daß neben Serin 170 und 172 noch andere CK2-Phosphorylierungsstellen in TIF-IA vorhanden sind. Daher wurde im folgenden die *in vivo* Phosphorylierung von FLAG-TIF-IA, FLAG-TIF-IAS170A und FLAG-TIF-IAS170A/S172A mittels zweidimensionaler Phospho-Peptid-Analysen untersucht. Die rekombinant exprimierte Protein wurden durch Inkubation der Zellen mit ³²P-Orthophosphat radioaktiv markiert, immunpräzipitiert und anschließend mit Trypsin verdaut. Die tryptischen Peptide wurden auf einer Dünnschicht-Cellulose-Platte zunächst elektrophoretisch (1. Dimension) und anschließend chromatographisch (2. Dimension) getrennt. Das Autoradiogramm der Dünnschicht-Cellulose-Platte zeigte bei Wildtyp-TIF-IA ein spezifisches Muster von 10 Phospho-Peptiden (**a-j**; Abb. 4.9A). Durch Phospho-Peptid-Analysen von verschiedenen TIF-IA Mutanten in vorhergehenden und parallelen Untersuchungen konnte die Identität der tryptischen Phospho-Peptide **a-g** bereits aufgeklärt werden (Zhao et al., 2003; Mayer et al., 2004; Mayer et al., 2005; J. Zhao, persönliche Mitteilung). Dagegen war im Vorfeld dieser Arbeit nicht bekannt, welchen Phosphorylierungsstellen in TIF-IA die Peptide **h-j** entsprechen. Allerdings waren auch bei der S170A-Mutante alle 10 Phospho-Peptide nachzuweisen (Abb. 4.9B). Die Peptide **h-j** zeigten aber eine veränderte Migration in der Chromatographie, so daß sie im Vergleich zum Wildtyp näher an Peptid **f** lagen.

Um zu überprüfen, ob das unterschiedliche Laufverhalten auf veränderte Eigenschaften der Peptide zurückzuführen war, wurden die Phospho-Peptide beider Präparationen gemischt und dann gemeinsam aufgetrennt (Abb. 4.9C). Während die Peptide **a-g** von Wildtyp-TIF-IA deckungsgleich mit denen der S170A-Mutante waren, waren an den Positionen **h-j** jeweils zwei Peptide mit geringen Laufunterschieden in der 2. Dimension zu finden. Somit verändert der Austausch von Serin 170 gegen Alanin tatsächlich die Eigenschaften dieser Phospho-Peptide, wodurch gezeigt wird, daß alle drei Wildtyp-Peptide diesen Serinrest enthalten. Die Markierung der TIF-IAS170A-Peptide **h-j**

durch radioaktives Phosphat, ist auf eine Phospho-Aminosäure zurückzuführen, die ebenfalls in den tryptischen Peptiden enthalten ist. Daß es sich hierbei um Phospho-Serin 172 handelt, wurde durch die Analyse der S170A/S172A-Doppelmutante deutlich (Abb. 4.9D). Während die Peptide **a-g** mit einer mit Wildtyp-TIF-IA vergleichbaren Signalintensität vorhanden sind, fehlten die Phospho-Peptide **h-j**. Die Peptide **h-j** des Wildtyp-Proteins sind demnach jeweils an beiden Serinresten phosphoryliert und resultieren wahrscheinlich aus einem partiellen Trypsin-Verdau von TIF-IA. Aufgrund des Vorliegens von drei teilweise überlappenden Peptiden, erfolgt die Trypsin-Spaltung in der Umgebung beider Phospho-Serine vermutlich an zwei Spaltstellen nicht vollständig. Durch eine *in silico* Trypsin-Spaltung von TIF-IA mit Hilfe des Programms „PeptideCutter“ (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>) wurden die in Frage kommenden Peptide weiter analysiert (Abb. 4.9 E). Das Programm ermittelt nicht nur die tryptischen Peptide eines Proteins aufgrund der theoretischen Trypsin-Spaltung nach Arginin- oder Lysinresten, sondern bewertet auch die Spaltungseffizienz aufgrund der die Arginin- und Lysinreste umgebenden Aminosäure-Sequenz. Gemäß dieser Analyse konnte eine klare Identifizierung der tryptischen TIF-IA-Peptide, die Serin 170 und 172 enthalten, nicht erfolgen. Vielmehr kann das Auftreten der drei Phospho-Peptide nur dadurch erklärt werden, daß eine Trypsin-Spaltstelle in der Nähe von Serin 170/172, die theoretisch effizient gespalten werden sollte, tatsächlich nur partiell verdaut wird.

Zusammenfassend läßt sich aus den Phospho-Peptid-Analysen die Schlußfolgerung ziehen, daß sowohl Serin 170 als auch Serin 172 in TIF-IA phosphoryliert vorliegt. Da sich die einzigen bisher nicht näher charakterisierten Phospho-Peptide **h-j** alle den Phospho-Serin 170 und 172 zuordnen lassen, wird TIF-IA *in vivo* nur an diesen Serinresten durch CK2 phosphoryliert. Die Phosphorylierung anderer Aminosäurereste in TIF-IA durch gereinigte CK2 (Abb. 4.8) ist demnach ein Artefakt der *in vitro* Reaktion und hat keinen Einfluß auf die Regulation von zellulärem TIF-IA.

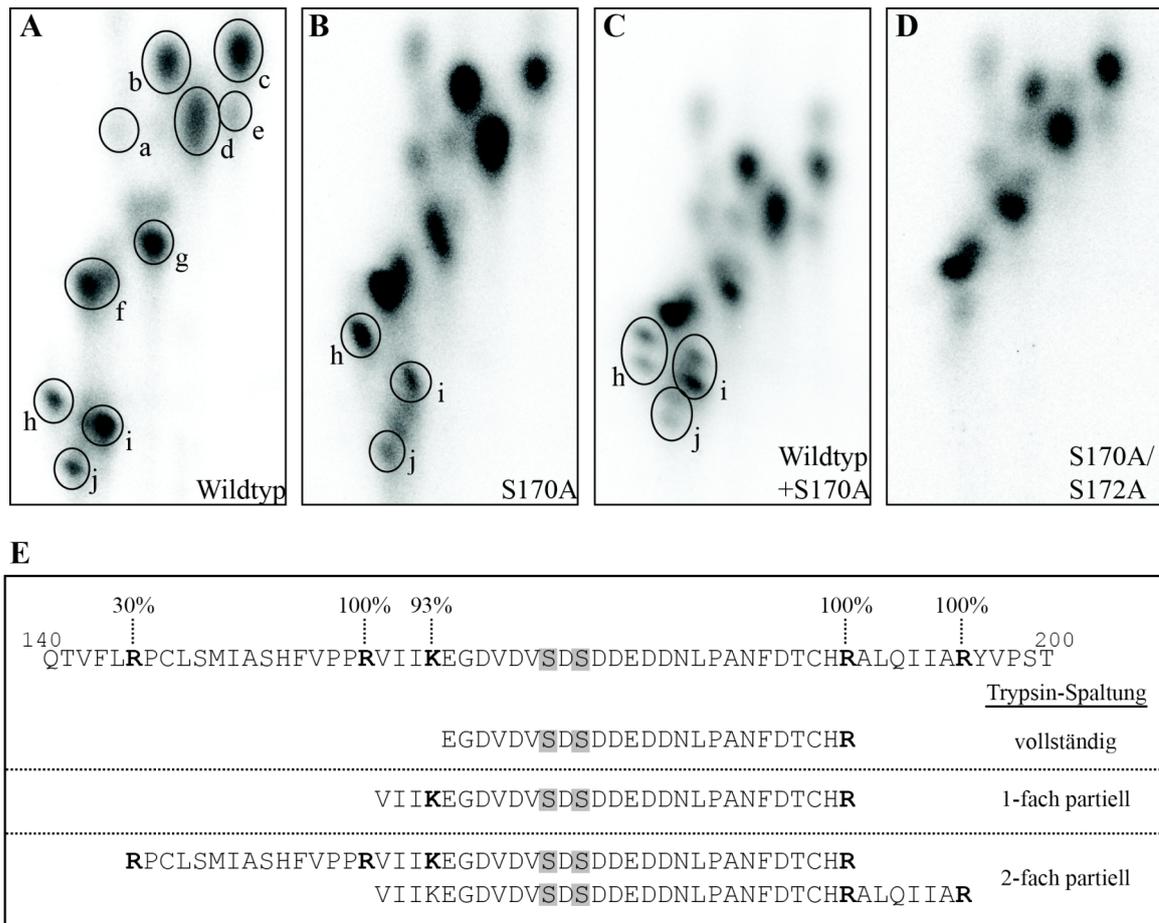


Abb. 4.9: Die Serine 170 und 172 in TIF-IA werden *in vivo* phosphoryliert.

(A)-(D) Phospho-Peptid-Analysen von verschiedenen TIF-IA Derivaten. FLAG-TIF-IA, FLAG-TIF-IAS170A und FLAG-TIF-IAS170A/S172A wurden rekombinant in HEK293T Zellen exprimiert und *in vivo* mit ^{32}P -Orthophosphat markiert. Danach wurden die Proteine immunpräzipitiert und mit Trypsin verdaut. Die Trennung der tryptischen Phospho-Peptide erfolgte auf einer Dünnschicht-Cellulose-Platte erst durch Elektrophorese (horizontale Trennung) und anschließend durch Chromatographie (vertikale Trennung).

(E) Analyse möglicher Phospho-Peptide, die die Serine 170 und 172 enthalten. Oberhalb ist die TIF-IA-Sequenz von Position 140 bis 200 dargestellt. Die Prozentzahlen über den Arginin- (R) und Lysinresten (K) geben die theoretische Vollständigkeit der Trypsin-Spaltung gemäß des Programms „PeptideCutter“ an. Die unterhalb aufgeführten Peptide resultieren theoretisch aus (i) einer vollständigen Trypsin-Spaltung, (ii) einer unvollständigen Spaltung nach dem N-terminal von Serin 170/172 gelegenen Lysinrest (1-fach partiell) und (iii) einer zusätzlichen unvollständigen Spaltung, die nach einem Argininrest entweder C- oder N-terminal von Serin 170/172 erfolgen kann (2-fach partiell).

4.2.4 Die Mutation von Serin 170 und 172 inhibiert die transkriptionelle Aktivität von TIF-IA

In den vorhergehenden Experimenten wurde zum einen die Abhängigkeit der TIF-IA Aktivität von CK2 (siehe 4.2.2), zum anderen die CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA an Serin 170 und 172 (siehe 4.2.3) gezeigt. Daher war anzunehmen, daß der Phosphorylierungsstatus von Serin 170 und 172 einen Einfluß auf die TIF-IA Aktivität hat. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Transkriptionsaktivität der TIF-

IAS170A/S172A-Mutante analysiert. Zunächst wurde die Stimulation der Expression von Pol I-Reportergenen in Zellen, die Wildtyp-TIF-IA oder TIF-IAS170A/S172A ektopisch exprimieren, verglichen. Als Reporterkonstrukte wurden die Plasmide pHrP2-BH und pBS-hrDNA-Luc-T4 verwendet. Während pHrP2-BH ein rekombinantes Mini-rRNA Gen enthält, bei dem zwischen rDNA Promotor- und Terminator-Sequenzen eine kurze pUC9-Vektor-Sequenz liegt, wird von pBS-hrDNA-Luc-T4 ein Luciferase-Gen unter Kontrolle des Pol I Promotors exprimiert. Zur Analyse der Reporter-Expression wurden HEK293T Zellen jeweils mit dem Expressionsplasmid für FLAG-TIF-IA oder FLAG-TIF-IAS170A/S172A sowie einem Reporterkonstrukt co-transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Pol I-Transkripte von pHr-P2-BH im Northern Blot mit einer zur Vektor-Sequenz komplementären Sonde detektiert (Abb. 4.10A). Die Pol I Transkription in Zellen mit pBS-hrDNA-Luc-T4 wurde anhand der Luciferase-Aktivität bestimmt. Hierfür wurden Zell-Lysate hergestellt, mit dem Luciferase-Substrat Luciferin inkubiert und die bei der Luciferin-Umsetzung entstehende Lichtemission wurde im Luminometer gemessen (Abb. 4.10B). Weiterhin wurde mittels Western Blots überprüft, ob FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A in vergleichbaren Mengen synthetisiert wurden (Abb. 4.10C).

In Zellen mit rekombinantem Wildtyp-TIF-IA wurde in Abhängigkeit von der Menge an FLAG-TIF-IA die Pol I Transkription beider Reporter gene stimuliert (Abb. 4.10A-C, Bahnen 2-4). Dabei wurde maximal eine Steigerung der Pol I Aktivität um das 2-fache beim Luciferase-Reporter bzw. das 2,5-fache bei pHr-P2-BH erreicht. Im Gegensatz dazu bewirkte die Synthese geringer Mengen an FLAG-TIF-IAS170A/S172A nur eine schwache Stimulation der Reporter-Expression (Abb. 4.10A-C, Bahnen 6 und 7). Durch die größte Menge an FLAG-TIF-IAS170A/S172A wurde die Pol I Aktivität sogar wieder auf ein Niveau von Zellen ohne rekombinanten TIF-IA gesenkt (Abb. 4.10A-C, Bahn 8). Es kann daher die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der Austausch von Serin 170 und 172 gegen Alanin die Fähigkeit von TIF-IA zur Stimulation der Pol I Transkription stark vermindert. Folglich ist die Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2 notwendig, um die Pol I Aktivität *in vivo* zu steigern.

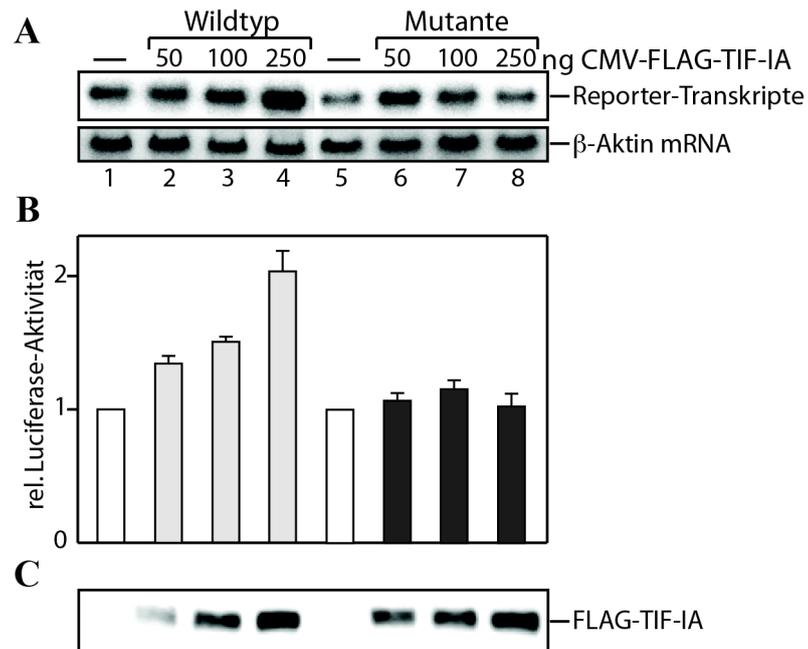


Abb. 4.10: Die TIF-IA-abhängige Stimulation von Pol I Reportergenen wird durch Mutation von Serin 170 und Serin 172 inhibiert.

(A) Analyse der Transkription eines Mini-rRNA Reportergens (pHrP2-BH) in HEK293T-Zellen, die zusätzlich mit verschiedenen Mengen an Expressionsplasmid (CMV-FLAG-TIF-IA) für Wildtyp-TIF-IA oder TIF-IAS170A/S172A (Mutante) transfiziert wurden. Die zelluläre RNA wurde im Northern Blot hinsichtlich Synthese der Reporter-Transkripte (obere Reihe) oder der β-Aktin mRNA (untere Reihe) untersucht.

(B) Expression des Pol I Luciferase-Reportergens. Zellen wurden analog zu (A) transfiziert wobei das Luciferase-Konstrukt pBS-hrDNA-Luc-T4 anstelle von pHrP2-BH verwendet wurde. Zudem wurden zur Normalisierung 25 ng des *Renilla*-Luciferase-Plasmids pRL-TK co-transfiziert. Nach Herstellung von Zell-Lysaten erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität im Luminometer unter Verwendung des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Im Diagramm ist die Luciferase-Aktivität in Lysaten aus Zellen ohne TIF-IA-Expressionsplasmid gleich 1 gesetzt. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

(C) Analyse der Synthese von FLAG-TIF-IA oder FLAG-TIF-IAS170A/S172A. Rekombinanter TIF-IA in den für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität hergestellten Zell-Lysaten wurde mittels anti-FLAG Antikörpern im Western-Blot detektiert.

Um die Aktivität von TIF-IAS170A/S172A direkt zu testen, wurden *in vitro* Transkriptionsanalysen in einem TIF-IA-responsiven System durchgeführt. Darüber hinaus sollte überprüft werden, inwieweit die Phosphorylierung von nur einem der beiden Serinreste für die TIF-IA Aktivität ausreichend ist. Zu diesem Zweck wurden Wildtyp-TIF-IA sowie die S170A/S172A-, S170A- und S172A-Mutanten in HEK293T Zellen exprimiert und durch Immunfällung isoliert. Von den gereinigten Proteinen wurden jeweils ca. 50 und 100 ng für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Wie in der Abb. 4.11A

dargestellt ist, wird durch Wildtyp-TIF-IA die Transkriptionsaktivität des Kernextraktes aus Wachstums-arretierten L1210-Zellen stark stimuliert (Bahnen 1-3). Im Gegensatz dazu wird durch die TIF-IA-Mutanten keine oder nur eine schwache Stimulation der Transkription erzielt (vgl. Bahn 1 mit Bahnen 4-9). In diesen Reaktionen wird das höchste Transkriptionsniveau durch FLAG-TIF-IAS172A erreicht (Bahnen 6-7), wobei die Stimulation immer noch deutlich schwächer im Vergleich zu Wildtyp-TIF-IA ist. Im Vergleich zu den anderen beiden Mutanten ist die Aktivität von TIF-IAS170A/S172A am stärksten verringert. Interessanterweise ist die Transkriptionsstimulation durch die höhere Menge an TIF-IAS170A/S172A schwächer als durch die niedrige Menge (Bahnen 8 und 9), was in ähnlicher Weise schon bei der Analyse der Reporter-Expression beobachtet wurde (Abb. 4.10). Zusammenfassend zeigt die Transkriptionsanalyse, daß der Austausch von Serin 170 und/oder Serin 172 gegen Alanin die TIF-IA Aktivität stark einschränkt.

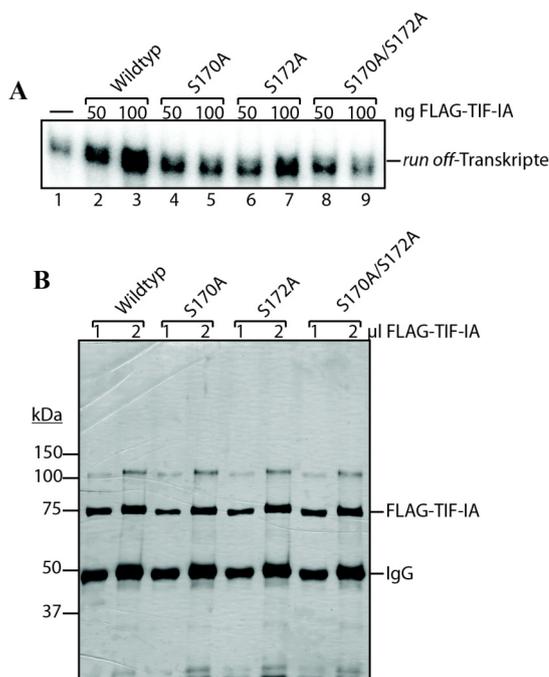


Abb. 4.11: Phospho-Serin 170 und 172 sind für die TIF-IA Aktivität essentiell.

(A) Analyse der Aktivität verschiedener TIF-IA Derivate in der *in vitro* Transkription. TIF-IA responsiver Kernextrakt aus wachstumsarretierten L1210 Zellen wurde mit FLAG-TIF-IA oder den S170A-, S172A- und S170A/S172A-Mutanten inkubiert und die Stimulation der transkriptionellen Aktivität des Extrakts wurde anhand der Synthese von *run off*-Transkripten bestimmt.

(B) Analyse der gereinigten TIF-IA Proteine. Die für die *in vitro* Transkription aus HEK293T Zellen immunpräzipitierten TIF-IA Derivate wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Silber gefärbt. Es wurden jeweils die TIF-IA Mengen aufgetragen, die auch in den Transkriptionsreaktionen eingesetzt wurden.

4.2.5 Die CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA ist für die Zellproliferation und Struktur des Nukleolus essentiell

Da TIF-IA ein essentieller Bestandteil des Pol I Transkriptionsapparats ist, ist es naheliegend, daß eine Deletion oder Inaktivierung von TIF-IA auch zu einer Inhibition der Zellproliferation führt. Tatsächlich führt die genetische Inaktivierung von TIF-IA in Fibroblasten aus Mausembryonen (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) nicht nur zum Verlust der Pol I Transkriptionsaktivität, sondern auch zur Auflösung der nukleolären

Strukturen und zur Arretierung der Zellen in der G₀- bzw. G₁-Phase des Zellzyklus. Um die Funktionalität der TIF-IAS170A/S172A-Mutante in Abwesenheit von endogenem TIF-IA zu untersuchen, wurden im folgenden MEFs aus *TIF-IA^{fl/fl}* Mausembryonen verwendet, bei denen durch Expression der Cre-Rekombinase die Inaktivierung des *TIF-IA*-Gens durch partielle Deletion induziert wird (Yuan et al., 2005). Zunächst wurden die *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs mit rekombinanten Retroviren infiziert, die entweder für FLAG-TIF-IA oder für FLAG-TIF-IAS170A/S172A kodieren. Die infizierten Zellen wurden selektioniert und die ektopische Expression von Wildtyp- und mutiertem TIF-IA wurde in Western Blot Analysen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Zur anschließenden Inaktivierung von endogenem TIF-IA wurden die Zellen mit MSCVcre-Retroviren, die für die Cre-Rekombinase kodieren, oder zur Kontrolle mit MSCV-Viren infiziert und 6 Tage nach der Infektion geerntet bzw. für die Fluoreszenz-Mikroskopie fixiert. Um in den MSCVcre-infizierten *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs die genetische Inaktivierung von TIF-IA zu überprüfen, wurden zelluläre DNA und RNA isoliert und die Integrität des *TIF-IA*-Gens bzw. der TIF-IA mRNA wurde mittels PCR und RT-PCR analysiert (Abb. 4.12A und B). Da im *TIF-IA^{fl/fl}* Allel die *loxP*-Sequenzen, die als Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase dienen, in den Introns 11 und 14 liegen, wird durch die homologe Rekombination ein 4500 bp langes Fragment des *TIF-IA*-Gens, das die Exons 12-14 umfaßt, deletiert (Yuan et al., 2005, siehe Schema in Abb. 4.12A). Für die PCR-Analyse der genomischen DNA wurden Oligonukleotide (In11 und Ex15) verwendet, die die *loxP*-Stellen flankieren und im intakten *TIF-IA*-Gen 6300 bp entfernt lokalisieren. Bei der Amplifikation des Nullallels entsteht demzufolge ein nur 1800 bp langes DNA-Fragment. Da die PCR-Bedingungen so gewählt wurden, daß sie nur die Synthese von DNA-Fragmenten bis 2000 bp ermöglichten, sollte bei der DNA aus *TIF-IA^{-/-}*-MEFs, nicht aber bei der DNA aus *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs eine Amplifikation erfolgen. Wie in der Abb. 4.13A gezeigt ist, wurde tatsächlich nur mit DNA aus MSCVcre-infizierten ein PCR-Produkt gebildet, während die DNA aus MSCV-infizierten Zellen mit den Oligonukleotiden In11 und Ex15 nicht amplifiziert wurde. Dagegen konnte in allen PCR-Reaktionen, in denen zur Kontrolle Oligonukleotide verwendet wurden, die in den *TIF-IA*-Exons 15 und 16 lokalisierten (Ex15 und Ex16), ein Fragment synthetisiert werden. Diese Daten belegen, daß durch die vorausgegangene Infektion mit FLAG-TIF-IA- oder FLAG-TIF-IAS170A/S172A-kodierenden Retroviren die MSCVcre-induzierte *TIF-IA*-Deletion in *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs nicht beeinträchtigt wird.

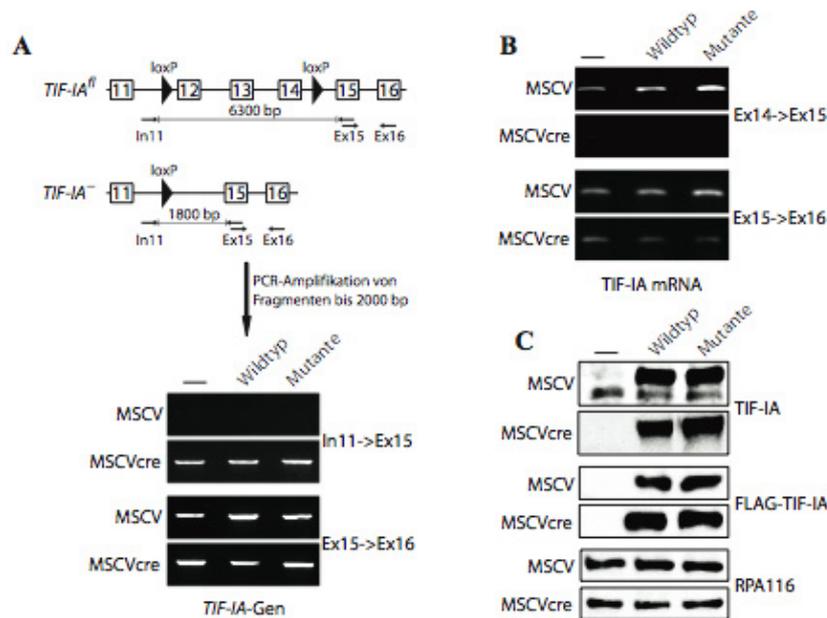


Abb. 4.12: Die Infektion von *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs mit MSCVcre führt zur genetischen Inaktivierung von TIF-IA.

TIF-IA^{fl/fl}-MEFs, die entweder keinen rekombinanten TIF-IA (-) oder FLAG-TIF-IA (Wildtyp) bzw. FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) exprimierten, wurden mit MSCV oder MSCVcre infiziert. Zur Analyse der Inaktivierung von TIF-IA wurden zelluläre DNA, RNA und Proteine isoliert und mittels PCR, RT-PCR und Western Blots analysiert.

(A) PCR-Analyse der genomischen DNA. Das Schema zeigt einen Ausschnitt der *TIF-IA^{fl}*- und *TIF-IA⁻*-Allele. Die Lage und Länge der dargestellten Exons (Boxen) und Introns (Striche) sind nicht maßstabsgetreu. Die Position der in der PCR-Analyse verwendeten Oligonukleotide (In11, Ex15, Ex16), sowie der Abstand von In11 und Ex15 sind eingezeichnet. Durch MSCVcre-induzierte Deletion der Exons 12-14 werden Intron 11 und Exon 15 räumlich angenähert, so daß eine Amplifikation mit In11 und Ex15 erfolgen kann. Dagegen sind In11 und Ex15 im intakten *TIF-IA*-Gen zu weit entfernt, um eine effiziente Amplifikation zu ermöglichen. Zur Standardisierung wurden PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden Ex15 und Ex16 durchgeführt

(B) Analyse der TIF-IA mRNA mittels RT-PCR. Zelluläre RNA wurde revers transkribiert und die cDNA wurde mit Oligonukleotiden die in Exon 14 und Exon 15 lokalisieren (Ex14 und Ex15) amplifiziert. Die Standardisierung erfolgte mit den Oligonukleotiden E15 und E16.

(C) Die Mengen an endogenem und rekombinanten TIF-IA sowie Pol I in MSCV- oder MSCVcre-infizierten *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs wurden in Western Blots mit anti-TIF-IA, anti-FLAG und anti-RPA116 Antikörpern analysiert. Bei der Detektion mit anti-TIF-IA Antikörpern lassen sich endogener und rekombinanter TIF-IA aufgrund des höheren apparenten Molekulargewichts von FLAG-TIF-IA unterscheiden.

Für die Analyse der TIF-IA mRNA wurde die isolierte RNA revers transkribiert und die cDNA als Matrize in PCR-Reaktionen mit zwei Oligonukleotiden (Ex14 und Ex15), die komplementär zu Bereichen in Exon 14 und 15 sind, eingesetzt (Abb. 412B). Während mit cDNA aus MSCV-infizierten Zellen ein Fragment amplifiziert wurde, war in PCR-Reaktionen mit cDNA aus MSCVcre-infizierten Zellen kein Produkt nachzuweisen,

was auf die Cre/*loxP*-vermittelte Deletion im *TIF-IA* Gen zurückzuführen ist. Dagegen wurde in allen Kontrollreaktionen mit den Oligonukleotiden Ex15 und Ex16 ein PCR-Produkt amplifiziert.

In Übereinstimmung mit den DNA- und RNA-Analysen war das endogene TIF-IA Protein in Lysaten aus *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs, nicht aber in Lysaten aus *TIF-IA^{-/-}*-MEFs mittels Western Blots nachweisbar (Abb. 4.13C). Dagegen wurde die Expression von FLAG-TIF-IA bzw. FLAG-TIF-IAS170A/S172A, sowie von RPA116, der zweitgrößten Pol I Untereinheit, nach retroviraler Infektion nicht beeinflusst. Zusammenfassend zeigen die Daten, daß nach Infektion von *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs mit MSCVcre, nicht aber mit MSCV, eine Deletion im *TIF-IA*-Gen erfolgt, die wiederum zur Synthese einer nicht funktionellen TIF-IA mRNA und damit zum Verlust von endogenem TIF-IA führt.

Um den Einfluß der Inaktivierung von TIF-IA auf die Morphologie der Zellen zu untersuchen, wurden *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs (MSCV-Infektion) und *TIF-IA^{-/-}*-MEFs (MSCVcre-Infektion) im Lichtmikroskop analysiert (Abb. 4.13). Hierbei konnte vor allem beobachtet werden, daß die Zellkerne in *TIF-IA^{-/-}*-MEFs, die keinen oder mutierten TIF-IA exprimierten, keine oder nur schwache nukleoläre Strukturen aufwiesen (Abb. 4.13, rechte Seite, Bilder oben und unten). Dagegen sind die Nukleolen in allen *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs sowie in *TIF-IA^{-/-}*-MEFs mit rekombinantem Wildtyp-TIF-IA deutlich zu erkennen (Abb. 4.13, Bilder linke Seite und rechte Seite Mitte). Die Veränderung der nukleolären Strukturen nach MSCVcre-Infektion von *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs wurde auch von Yuan et al. (2005) beobachtet und ist charakteristisch für die TIF-IA Inaktivierung. Da nur durch Überexpression von FLAG-TIF-IA die Ausbildung des MSCVcre-induzierten Phänotyps verhindert wurde, ist zu vermuten, daß in *TIF-IA^{-/-}*-MEFs nur der ektopisch exprimierte Wildtyp-TIF-IA, nicht aber die S170A/S172A-Mutante, die Inaktivierung des endogenen TIF-IA kompensieren kann.

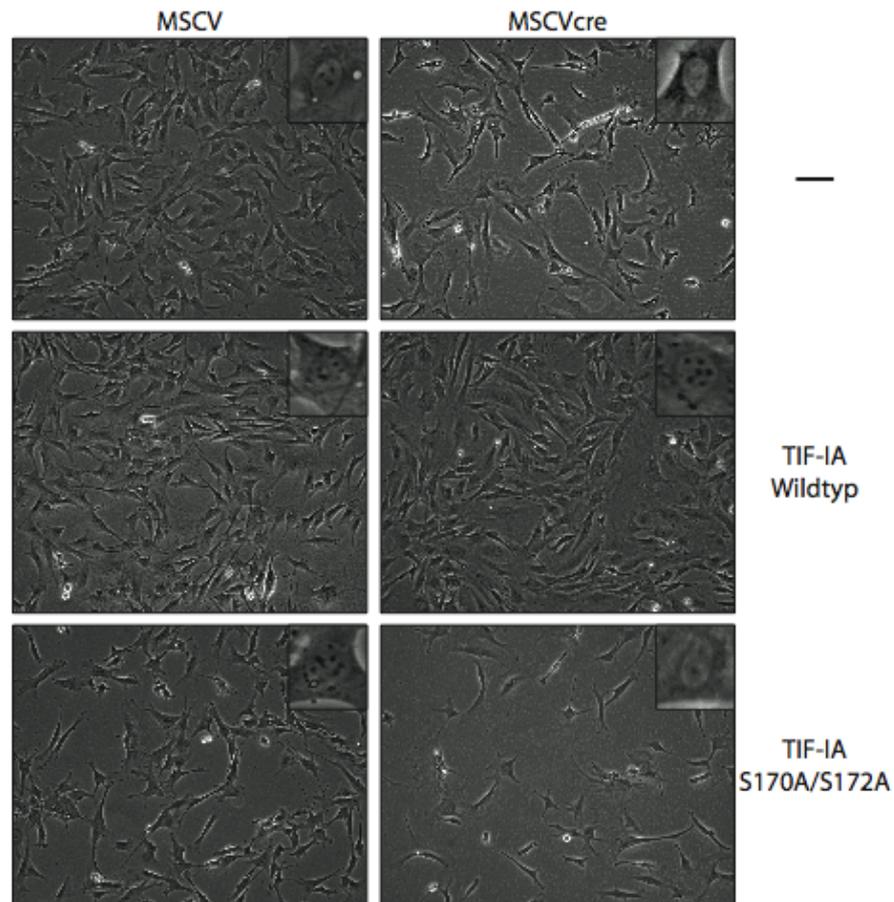


Abb. 4.13: Die Expression von FLAG-TIF-IAS170A/S172A in $TIF-IA^{-/-}$ -MEFs kann die Auflösung nukleolärer Strukturen nicht verhindern.

$TIF-IA^{fl/fl}$ -MEFs, die entweder keinen rekombinanten TIF-IA (obere Reihe) oder FLAG-TIF-IA (mittlere Reihe) bzw. FLAG-TIF-IAS170A/S172A (untere Reihe) exprimierten wurden mit MSCV (linke Spalte) oder MSCVcre (rechte Spalte) infiziert. 6 Tage nach der Infektion wurde die Morphologie der Zellen im Lichtmikroskop analysiert. In den lichtmikroskopischen Bildern ist jeweils rechts oben der Kern einer repräsentativen Zelle in 5-facher Vergrößerung gezeigt.

Neben dem Verlust der Pol I Transkriptionsaktivität, führt die Inaktivierung von TIF-IA auch zur Inhibierung der Zellproliferation (Yuan et al., 2005). Bereits die lichtmikroskopische Analyse zeigte, daß in $TIF-IA^{-/-}$ -MEFs nach Überexpression von FLAG-TIF-IAS170A/S172A die Struktur der Nukleolen beeinträchtigt ist (Abb. 4.13). Darüber hinaus konnte bei diesen Zellen auch ein im Vergleich zu $TIF-IA^{fl/fl}$ -MEFs deutlich langsames Wachstum festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um experimentell nachzuweisen, daß TIF-IAS170A/S172A nach Inaktivierung des endogenen TIF-IA nicht in der Lage ist, eine Arretierung der Zellen im Zellzyklus zu verhindern, wurden die zelluläre Menge verschiedener Zellzyklus-Regulatoren analysiert (Abb. 4.14).

In der Tat führte die TIF-IA-Inaktivierung in *TIF-IA*^{-/-}-MEFs zu einer deutlichen Verringerung der Menge an Cyclin A, B1 und E. Dagegen blieb die Menge an Cyclin D1, das in der G₁-, M- und G₂-Phase des Zellzyklus gleichermaßen abundanter ist (Hitomi und Stacey; 1999), unverändert (Abb. 4.14B, Bahn 1). Eine noch stärkere Verringerung der Cyclin A, B1 und E Mengen wurde bei *TIF-IA*^{-/-}-MEFs, die FLAG-TIF-IAS170A/S172A exprimierten, festgestellt (Bahn 3), während die ektopische Expression von Wildtyp-TIF-IA dazu führte, daß die Menge aller analysierten Cyclin-Proteine konstant blieb, unabhängig davon, ob die Zellen mit MSCV oder MSCVcre infiziert wurden (Bahn 2). Hieraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß TIF-IAS170A/S172A nicht in der Lage ist, Wildtyp-TIF-IA funktionell zu komplementieren und die Inhibierung der Zellproliferation zu vermeiden. Vielmehr scheint die Expression der Mutante in *TIF-IA*^{-/-}-Zellen die Arretierung im Zellzyklus noch zu verstärken. Demnach ist die CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA auch für die Zellproliferation essentiell.

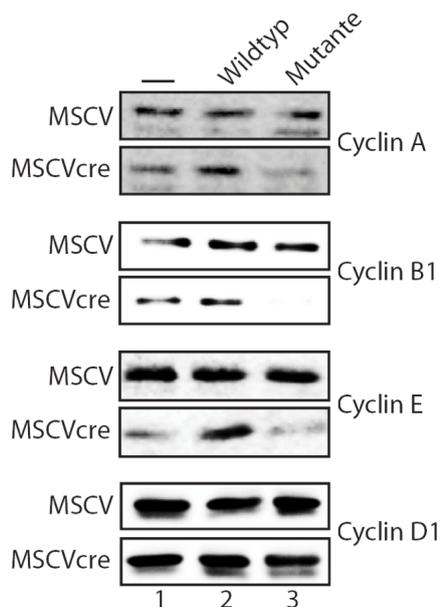


Abb. 4.14: Die Inhibierung der Proliferation von *TIF-IA*^{-/-}-MEFs, wird durch Expression von FLAG-TIF-IAS170A/S172A nicht aufgehoben.

In Western Blots wurden die Mengen an Cyclin A, B1, E und D1 in MSCV- oder MSCVcre-infizierten *TIF-IA*^{fl/fl}-MEFs, die entweder keinen rekombinanten TIF-IA (-) oder FLAG-TIF-IA (Wildtyp) bzw. FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) exprimierten, nachgewiesen.

Obwohl bekannt ist, daß nach der Mitose für die Neubildung von Nukleolen aktive Pol I Transkription notwendig ist (Schwarzacher und Wachtler, 1993), sind die Mechanismen, die die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Nukleolus-Struktur bewirken, nur ansatzweise verstanden. Ein Charakteristikum von *TIF-IA*^{-/-} Zellen ist eine starke Verkleinerung der Nukleolen und die Auflösung nukleolärer Strukturen, was mit der Freisetzung von nukleolären Faktoren in das Nukleoplasma einhergeht (Yuan et al., 2005). Um zu überprüfen, ob in *TIF-IA*^{-/-}-MEFs nach Expression von FLAG-TIF-IAS170A/S172A die Komponenten des Pol I Transkriptionsapparats nach wie vor im

Nukleolus lokalisieren, wurde durch indirekte Immunfluoreszenz die Lokalisation von TIF-IA, Pol I und UBF in MSCV- und MSCVcre-infizierten Zellen untersucht (Abb. 4.15 und 4.16). Dabei wurde für die Färbung von TIF-IA ein Antikörper verwendet, der sowohl das endogene als auch das rekombinante Protein erkennt. In allen *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs waren TIF-IA, Pol I und UBF ausschließlich in den Nukleolen lokalisiert. Eine nukleoläre Lokalisation der Faktoren nach Infektion mit MSCVcre wurde dagegen nur in *TIF-IA^{-/-}*-MEFs mit rekombinantem Wildtyp-TIF-IA beobachtet. MSCVcre-infizierte Zellen ohne rekombinanten TIF-IA wiesen bereits im Phasenkontrast keine deutlich erkennbaren Nukleolen auf. Bei der Detektion von TIF-IA erfolgte keine Färbung, wodurch in Übereinstimmung mit der Western-Blot-Analyse (Abb. 4.13B) der Verlust des Proteins belegt wurde. Die Immunfluoreszenz mit Pol I- und UBF-Antikörpern in diesen Zellen zeigte eine diffuse Verteilung beider Faktoren im Zellkern, wobei punktuell eine intensive Färbung auftrat, die möglicherweise auf stark verkleinerte, im Phasenkontrast nicht mehr sichtbare Nukleolen zurückzuführen ist. In *TIF-IA^{-/-}*-MEFs, die FLAG-TIF-IAS170A/S172A exprimierten, resultierte die Cre-vermittelte *TIF-IA*-Deletion in einer ähnlichen Lokalisation der untersuchten Faktoren wie in Zellen ohne rekombinanten TIF-IA. Auch hier waren keine Nukleolen im Phasenkontrast erkennbar und Pol I und UBF waren wiederum im Zellkern verteilt. Die Analyse der Lokalisation von TIF-IA zeigte eine diffuse Färbung sowohl des Kerns als auch des Cytoplasmas, wobei es sich vermutlich um die delokalisierte TIF-IA-Mutante handelte, da die Zellen über keinen endogenen TIF-IA mehr verfügten (Abb 4.13B). Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß durch Mutation der CK2-Phosphorylierungsstellen in TIF-IA die Funktionalität des Faktors vollständig eingeschränkt wird. Die Aktivität der TIF-IAS170A/S172A-Mutante ist so stark reduziert, daß eine für die Zellproliferation und Integrität der Nukleolen notwendige rRNA Synthese nicht mehr erfolgt kann.

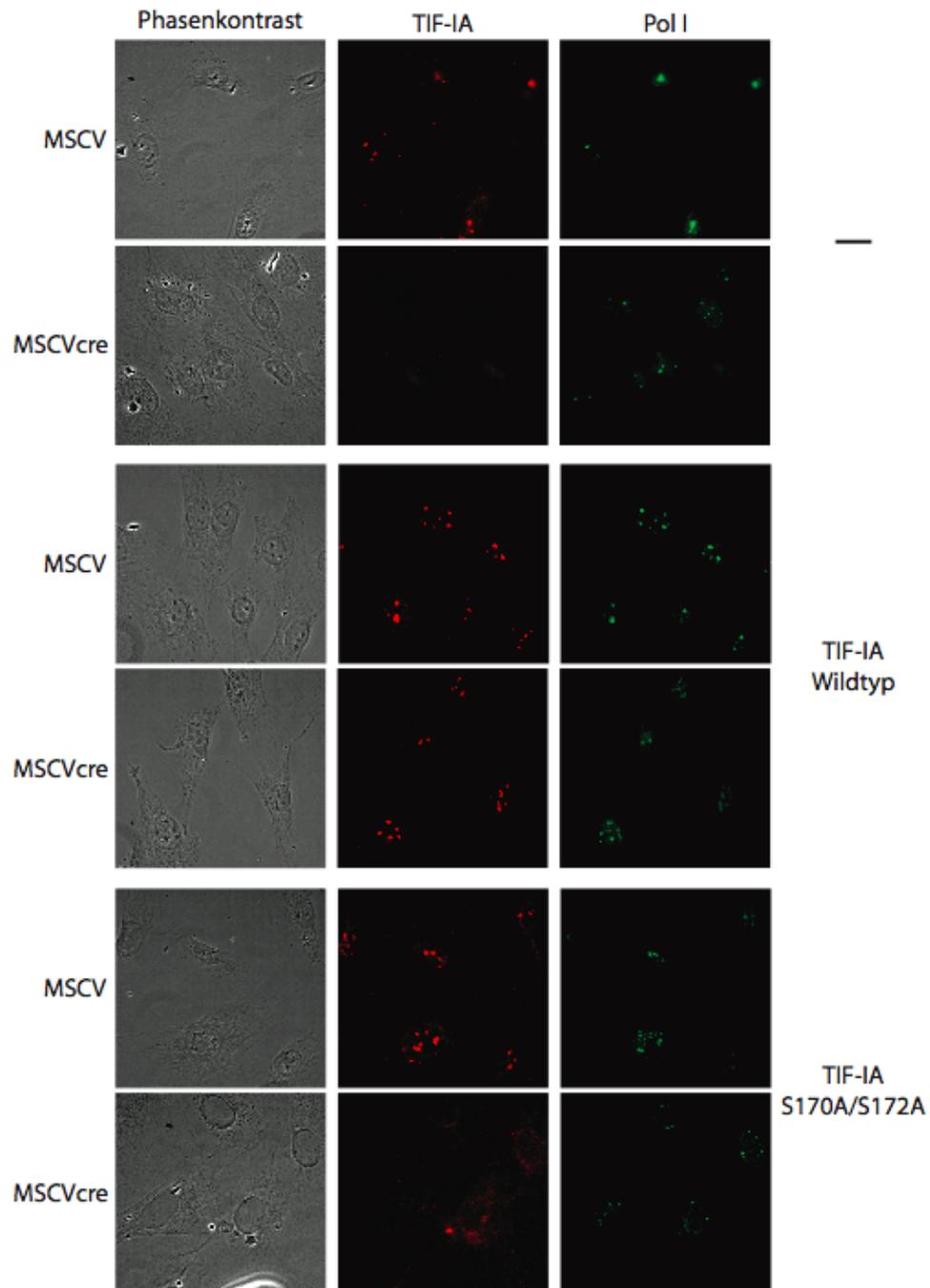


Abb. 4.15: TIF-IA S170A/S172A kann die Delokalisierung des Pol I Transkriptionsapparates nach Inaktivierung von endogenem TIF-IA nicht verhindern.

Die Lokalisation von TIF-IA und Pol I wurde in MSCV- oder MSCVcre-infizierten *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs mit anti-TIF-IA Antikörpern, die endogenen und rekombinanten TIF-IA erkennen, und mit Antikörpern gegen RPA194 durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Phasenkontrast-Bilder sind in der linken Spalte zu sehen.

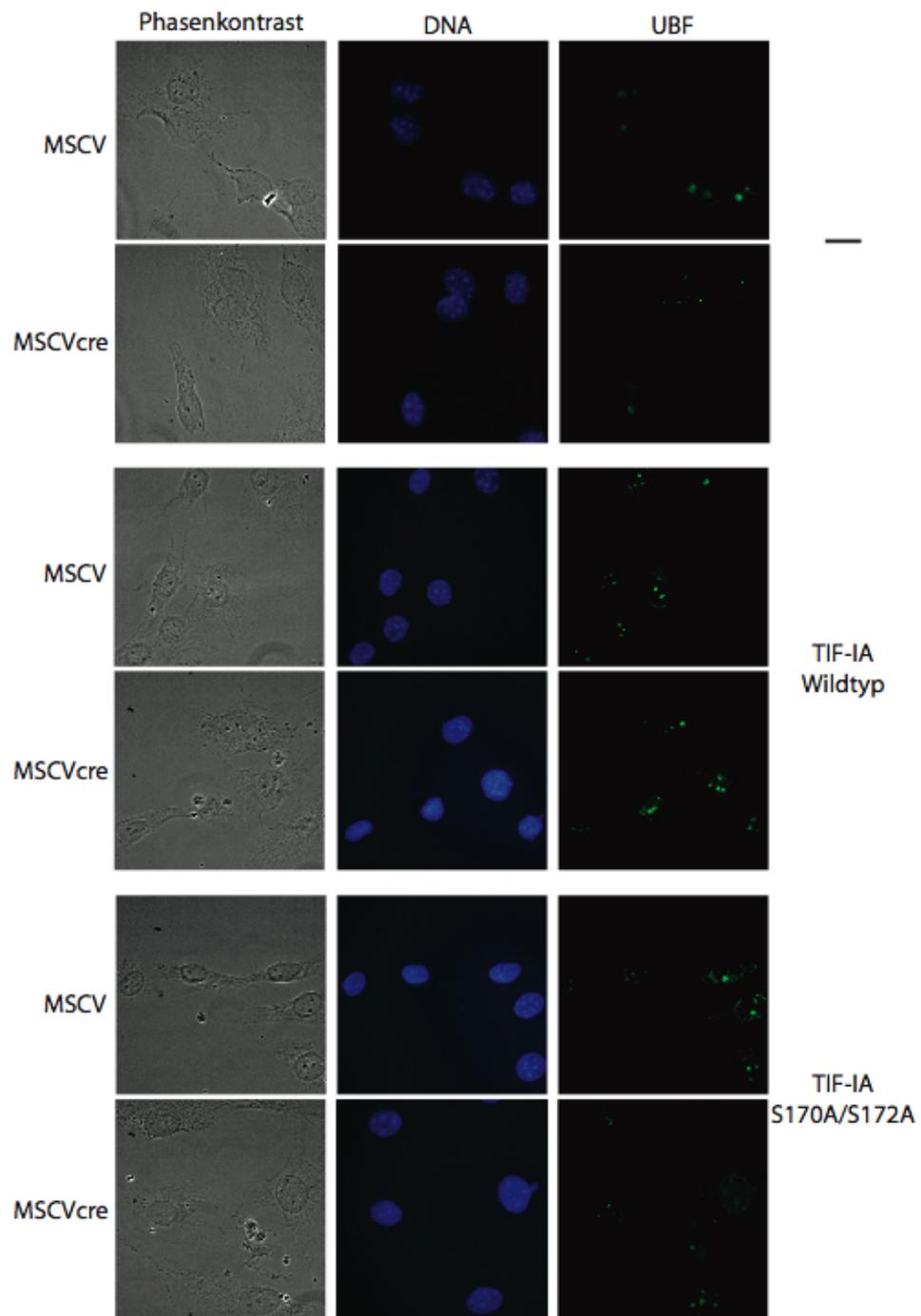


Abb. 4.16: TIF-IA^{S170A/S172A} kann die Delokalisierung von UBF nach Inaktivierung von endogenem TIF-IA nicht verhindern.

Die Lokalisation von UBF wurde in MSCV- oder MSCVcre-infizierten *TIF-IA^{fl/fl}*-MEFs durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Phasenkontrast-Bilder sind in der linken Spalte zu sehen. In der mittleren Spalte ist die Färbung der Kern-DNA mit Hoechst 33258 gezeigt.

4.2.6 Inhibierung der Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2 verstärkt die Assoziation von TIF-IA mit Pol I

In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Interaktion von TIF-IA mit TIF-IB und Pol I durch den Phosphorylierungsstatus von TIF-IA reguliert wird (Mayer et al., 2004; Philimonenko et al., 2004; Mayer et al., 2005). Um den molekularen Mechanismus, der der Regulation von TIF-IA durch CK2 zugrunde liegt, zu untersuchen, wurden im folgenden Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt. In Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurde zunächst die Assoziation von Wildtyp-TIF-IA und TIF-IAS170A/S172A mit TIF-IB in HEK293T- und NIH3T3-Zellen analysiert (Abb. 4.17). Sowohl die Synthese von FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A in beiden Zell-Linien (Abb. 4.17, Bahnen 2 und 3), als auch die präzipitierten Mengen beider Proteine waren vergleichbar (Bahnen 5 und 6). Die Analyse von co-präzipitiertem TAF₁₁₀ bzw. TAF₉₅ ergab keinen Unterschied bei der Assoziation mit Wildtyp-TIF-IA und der S170A/S172A-Mutante (Abb. 4.12, Bahnen 5 und 6). Folglich hat die Mutation der CK2-Phosphorylierungsstellen in TIF-IA keinen Effekt auf die Interaktion von TIF-IA mit TIF-IB.

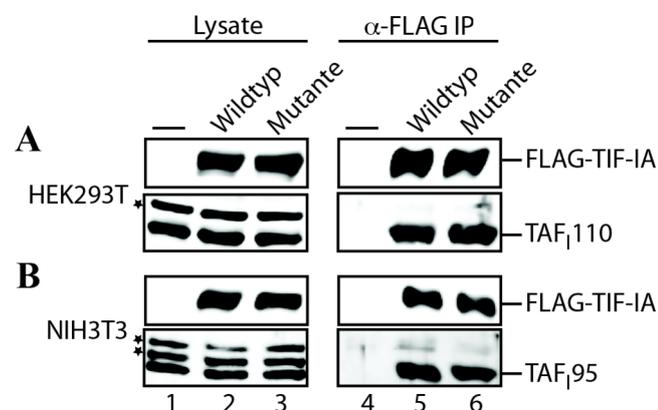


Abb. 4.17: Die CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA hat keinen Effekt auf die Interaktion von TIF-IA mit TIF-IB.

FLAG-TIF-IA (Wildtyp) und FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) wurden nach ectopischer Expression in HEK293T oder NIH3T3 Zellen mit anti-FLAG Antikörpern präzipitiert (α -FLAG IP). Die Immun-Komplexe wurden hinsichtlich rekombinantem TIF-IA oder der TIF-IB Untereinheit TAF₁₁₀ bzw. TAF₉₅ im Western-Blot untersucht. Aliquots der Zell-Lysate wurden vor der Immunpräzipitation abgenommen und ebenfalls analysiert. Sterne markieren in den Lysaten auftretende unspezifische Banden.

(A) Analyse der TIF-IA-TAF₁₁₀ Interaktion in HEK293T Zellen.

(B) Analyse der TIF-IA-TAF₉₅ Interaktion in NIH3T3 Zellen.

Analog zu den TIF-IA/TIF-IB Interaktionsstudien wurde die Assoziation von Wildtyp-TIF-IA bzw. TIF-IAS170A/S172A mit Pol I getestet. FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A wurden aus HEK293T- und NIH3T3-Zell-Lysaten präzipitiert und co-präzipitierte Pol I wurde mit Antikörpern gegen RPA116 und PAF53 in Immun-Blots nachgewiesen (Abb. 4.18). Wie im vorhergehenden Experiment waren das Expressionsniveau sowie die Präzipitationseffizienz von FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A vergleichbar (Abb. 4.18A und B, Bahnen 2 und 3). Im Gegensatz zu TIF-IB wurden aber unterschiedliche Mengen an Pol I mit Wildtyp- und mutiertem TIF-IA co-präzipitiert. In beiden Zell-Linien war deutlich mehr Pol I an FLAG-TIF-IAS170A/S172A als an Wildtyp-TIF-IA gebunden (Abb. 4.18, Bahnen 5 und 6). Insgesamt ergab sich eine ca. 2,5-fach stärkere Assoziation von Pol I mit FLAG-TIF-IAS170A/S172A als mit FLAG-TIF-IA, obwohl beide TIF-IA-Proteine in den Lysaten im gleichen Verhältnis zu Pol I vorlagen (Abb. 4.18C). Somit kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die CK2-abhängige Phosphorylierung von TIF-IA an Serin 170 und 172 die Interaktion mit Pol I inhibiert.

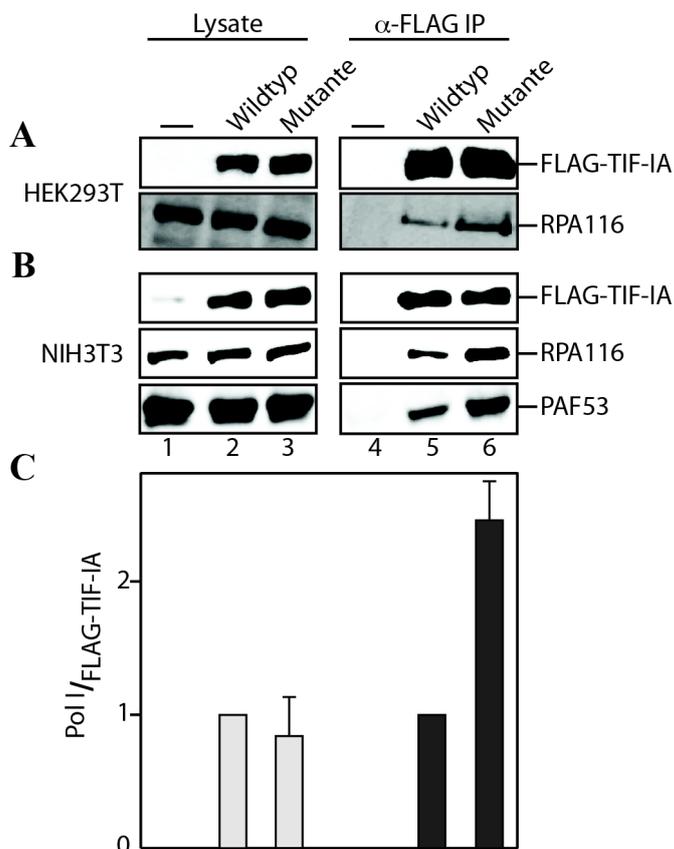


Abb. 4.18: Die Mutation der CK2-Phosphorylierungsstellen in TIF-IA verstärkt die Assoziation mit Pol I.

FLAG-TIF-IA (Wildtyp) und FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) wurden aus HEK293T oder NIH3T3 Zellen präzipitiert (α -FLAG IP) und co-präzipitierte Pol I wurde mit anti-RPA116 oder anti-PAF53 Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Aliquots der Zell-Lysate vor der Immunpräzipitation dienten zur Expressionsanalyse der untersuchten Proteine. Die Interaktionsanalysen sind in (A) für HEK293T und in (B) für NIH3T3 Zellen dargestellt. In (C) ist das quantitative Verhältnis von Pol I Untereinheiten zu rekombinantem TIF-IA in den Lysaten und Immun-Komplexen dargestellt. Nach Quantifikation der Western-Blot Signale mit dem Programm „AIDA“, wurden die Signalstärken von RPA116 bzw. PAF53 in Relation zur Signalstärke von rekombinantem TIF-IA berechnet. Der Mittelwert für das Pol I/FLAG-TIF-IA Verhältnis wurde gleich 1 gesetzt. Relativ dazu wurde das Verhältnis von RPA116 bzw. PAF53 zu FLAG-TIF-IAS170A/S172A berechnet. Die Ansätze ohne rekombinanten TIF-IA wurden nicht berücksichtigt.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die die Interaktion von TIF-IA und Pol I durch CK2-abhängige Phosphorylierung regulieren, sollte im folgenden untersucht werden, ob eine verstärkte Interaktion zwischen Pol I und FLAG-TIF-IAS170A/S172A auch in der Präzipitation von Pol I nachgewiesen werden kann und ob die Assoziation von Pol I und FLAG-TIF-IA auch durch Inhibition von CK2 verstärkt wird. Um diese Fragen zu untersuchen, wurden HEK293T Zellen, die FLAG-TIF-IA oder FLAG-TIF-IAS170A/S172A überexprimierten, mit dem CK2-Inhibitor DMAT behandelt und Pol I wurde mit einem humanen Auto-Immunsereum gegen die größte Untereinheit RPA194 präzipitiert. Pol I-assoziiierter FLAG-TIF-IA bzw. FLAG-TIF-IAS170A/S172A wurde im Western-Blot nachgewiesen. Wie in der Abb. 4.19A dargestellt ist, enthielten alle verwendeten Lysate vergleichbare Mengen an Pol I (RPA116) und rekombinanten TIF-IA (Bahnen 1-5). Die Effizienz der Pol I-Präzipitation war ebenfalls in allen Ansätzen annähernd gleich (obere Reihe, Bahnen 6-10). Im Gegensatz dazu unterschied sich die Menge an co-präzipitiertem TIF-IA in den einzelnen Ansätzen signifikant (untere Reihe, Bahnen 6-10). Während nur eine geringe Menge an FLAG-TIF-IA aus unbehandelten Zellen mit Pol I assoziiert vorlag, wurde nach DMAT-Behandlung diese Assoziation deutlich erhöht (Bahnen 7 und 8). Im Vergleich dazu interagierte FLAG-TIF-IAS170A/S172A noch stärker mit Pol I. Die Gabe von DMAT hatte dagegen bei der TIF-IA-Mutante keinen Einfluß auf die Bindung an Pol I (Bahnen 9 und 10). Diese Daten bestätigen, daß die Verhinderung der CK2-abhängigen Phosphorylierung von rekombinanten TIF-IA zu einer verstärkten Interaktion mit Pol I führt. Dabei ist dieser Effekt unabhängig davon, ob TIF-IA aufgrund der Mutation der CK2-Phosphorylierungsstellen oder durch Inhibition von CK2 nicht mehr phosphoryliert werden kann. Da die DMAT-Behandlung keine Steigerung der Assoziation zwischen Pol I und FLAG-TIF-IAS170A/S172A bewirkte, kann zudem gefolgert werden, daß die CK2-abhängige Regulation der Pol I/TIF-IA-Interaktion ausschließlich über die Phosphorylierung von TIF-IA erfolgt.

In den bisher durchgeführten Interaktionsstudien wurde ausschließlich rekombinanter TIF-IA eingesetzt. Um zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen endogenem TIF-IA und Pol I in gleicher Weise durch CK2 reguliert wird, wurden aus unbehandelten oder mit DMAT behandelten HEK293T Zellen Pol I Komplexe mit anti-RPA194 Antikörpern präzipitiert und assoziierter TIF-IA wurde im Immun-Blot detektiert (Abb. 4.19B). Ausgehend von gleichen Mengen an Pol I und TIF-IA in den verschiedenen Ansätzen (obere und untere Reihe, Bahnen 1-3), wurden gleiche Mengen an Pol I

präzipitiert (obere Reihe, Bahnen 5-7), wohingegen die Menge an co-präzipitiertem TIF-IA in Abhängigkeit von der Behandlung der Zellen variierte. Während in Zellen, die nur mit Lösungsmittel behandelt wurden, vergleichsweise wenig TIF-IA mit Pol I assoziiert war, wurde nach DMAT-Behandlung die Interaktion zwischen TIF-IA und Pol I deutlich erhöht, wobei die Stärke der Assoziation mit der DMAT-Konzentration zunahm (untere Reihe, Bahnen 5-7). Da dieses Ergebnis zeigt, daß zellulärer TIF-IA in gleicher Weise wie rekombinanter TIF-IA durch CK2 reguliert wird, handelt es sich demzufolge um einen Mechanismus der nicht nur bei Überexpression von TIF-IA, sondern auch unter natürlichen Bedingungen relevant ist.

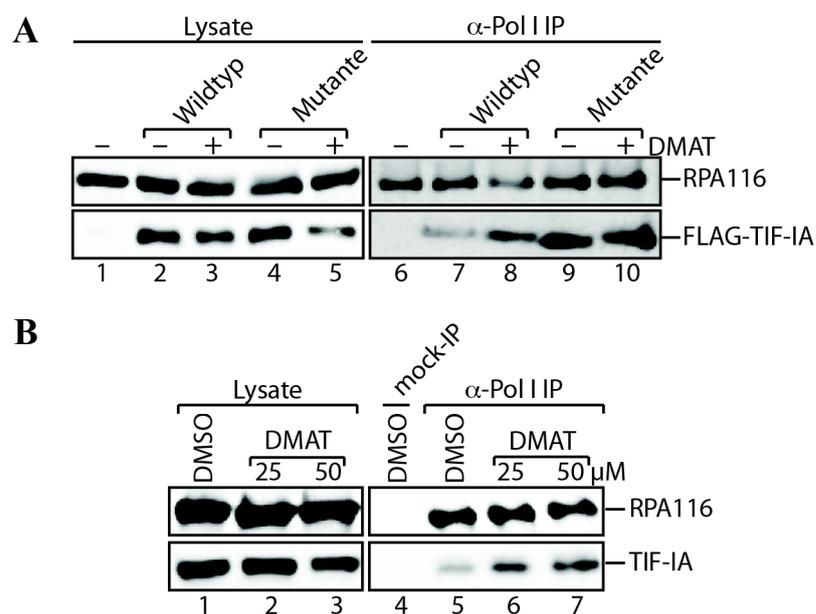


Abb. 4.19: Die Assoziation zwischen TIF-IA und Pol I wird durch Inhibierung von CK2 verstärkt.

(A) FLAG-TIF-IA (Wildtyp) und FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) wurden in HEK293T ektopisch exprimiert und ein Teil der Zellen wurde mit 50 μ M DMAT oder dem Lösungsmittel DMSO für zwei Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Pol I wurde mit anti-RPA194 Antikörpern präzipitiert (α -Pol I IP). Mittels Western Blots wurden RPA116 und rekombinanter TIF-IA in den Lysaten und Immun-Komplexen nachgewiesen.

(B) Pol I wurde mit anti-RPA194 Antikörpern aus HEK293T Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an DMAT oder dem Lösungsmittel DMSO für zwei Stunden behandelt wurden, immunpräzipitiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitation diente ein Ansatz ohne Antikörper (mock-IP).

4.2.7 CK2 inhibiert die Ausbildung initiationskompetenter TIF-IA-Pol I Komplexe

Nur ein kleiner Teil der Pol I Komplexe in Säugerzellen ist mit TIF-IA assoziiert und bilden die als Pol I β bezeichnete, initiationskompetente Form des Transkriptionsapparats

(Miller et al., 2001). Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, daß Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2 die Assoziation mit Pol I negativ reguliert. Diese Ergebnisse erlauben aber keine Aussage darüber, ob durch CK2 phosphorylierter TIF-IA nicht mehr in der Lage ist, mit Pol I zu interagieren, oder ob die Phosphorylierung nur die Stärke der Interaktion moduliert. Während die erste Möglichkeit eine inhibitorische Funktion von CK2 bei der Bildung von Pol I β impliziert, könnte die zweite Möglichkeit auf eine mechanistische Funktion bei der Transkriptionsinitiation hinweisen. Um zwischen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden Antikörper gegen ein Peptid, das die Aminosäuren 167-175 von TIF-IA enthält und in dem Serin 170 und 172 phosphoryliert sind, hergestellt. Das Immunsrum aus Kaninchen wurde gegen das gleiche Peptid affinitätsgereinigt, so daß der Antikörper spezifisch die Phospho-Serine 170 und 172 in TIF-IA (TIF-IApS170/pS172) erkennt. Die Phospho-Spezifität des Antikörpers wurde in Western-Blots mit FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A nachgewiesen, wobei nur das Wildtyp-Protein, nicht aber die phosphorylierungsdefiziente Mutante detektiert wurde (Abb. 4.20A, Bahnen 3 bis 10). Um den Phosphorylierungsstatus von S170 und S172 in Pol I assoziiertem TIF-IA zu untersuchen, wurden FLAG-TIF-IA oder FLAG-TIF-IAS170A/S172A in HEK293T Zellen überexprimiert und mit anti-FLAG Antikörpern präzipitiert. Anschließend wurden die Proteine von den immobilisierten Antikörpern eluiert und es folgte eine weitere Präzipitation mit anti-RPA194 Antikörpern. Durch diese zweite Immunfällung wurde Pol I-assoziiertes TIF-IA von freiem TIF-IA im Eluat getrennt. Die Western-Blot-Analyse beider TIF-IA Fraktionen mit anti-FLAG Antikörpern zeigte, daß nur ein kleiner Teil von FLAG-TIF-IA und FLAG-TIF-IAS170A/S172A mit Pol I co-präzipitierte (Abb. 4.20A, Bahnen 3-10). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Abschnitt 4.2.6 war die Mutante vergleichsweise stärker als der Wildtyp mit Pol I assoziiert (obere Reihe, Bahnen 3 und 7). Im Immun-Blot mit den phospho-spezifischen anti-TIF-IA Antikörpern wurde nur direkt präzipitierter FLAG-TIF-IA detektiert (Bahnen 4-6). Im Gegensatz dazu wurde weder der mit Pol I co-präzipitierte Wildtyp-TIF-IA noch FLAG-TIF-IAS170A/S172A erkannt (untere Reihe, Bahn 3 und Bahnen 7 bis 10). Demzufolge interagiert FLAG-TIF-IA nur mit Pol I, wenn das Protein nicht an Serin 170 und 172 phosphoryliert ist. Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß zumindest bei rekombinantem TIF-IA die CK2-vermittelte Phosphorylierung die Ausbildung initiationskompetenter Pol I β Komplexe inhibiert.

Um nachzuweisen, daß auch die Interaktion von endogenem TIF-IA mit Pol I durch die Phosphorylierung von Serin 170 und 172 inhibiert wird, wurde als nächstes der

Phosphorylierungsstatus von freiem und Pol I-gebundenem TIF-IA aus HeLa-Zellkernextrakten untersucht. Zu diesem Zweck wurde TIF-IA direkt präzipitiert oder mit Pol I co-präzipitiert und unter Verwendung phospho-spezifischer und polyklonaler anti-TIF-IA Antikörper analysiert (Abb. 4.20B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für rekombinanten TIF-IA wurde auch hier nur der direkt präzipitierte TIF-IA von den phospho-spezifischen Antikörpern erkannt, während mit den polyklonalen Antikörpern nachgewiesen wurde, daß gleiche Mengen an freiem und Pol I-gebundenem TIF-IA bei der Analyse eingesetzt wurden (Bahnen 6 und 8). Somit konnte auch für endogenen TIF-IA gezeigt werden, daß die CK2-vermittelte Phosphorylierung von Serin 170 und 172 die Assoziation von TIF-IA mit Pol I verhindert. Obwohl diese Phosphorylierung notwendig für die Pol I Transkription ist (Abschnitt 4.2.4 und 4.2.5), inhibiert sie erstaunlicherweise dennoch die Funktion von TIF-IA bei der Bildung des Initiationskomplexes. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß TIF-IA bei einem für die rRNA-Synthese essentiellen Schritt nach der Transkriptionsinitiation durch CK2 phosphoryliert wird.

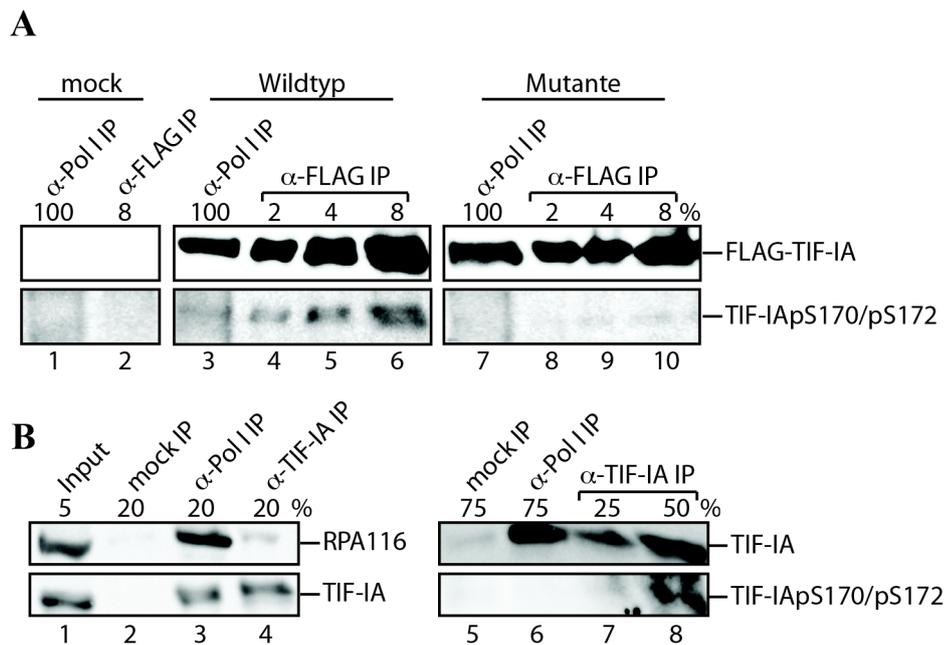


Abb. 4.20: Die CK2-abhängige Phosphorylierung inhibiert die Interaktion zwischen TIF-IA und Pol I.

(A) FLAG-TIF-IA (Wildtyp) und FLAG-TIF-IAS170A/S172A (Mutante) wurden aus HEK293T mit anti-FLAG Antikörpern präzipitiert und anschließend von den immobilisierten Antikörpern durch Zugabe von FLAG-Peptid eluiert. Es folgte eine weitere Präzipitation mit anti-RPA194 Antikörpern (α -Pol I IP), um Pol I-assoziierten und freien TIF-IA zu trennen. Bei der Western Blot Analyse beider Fraktionen wurde mit anti-FLAG Antikörpern die Präzipitationseffizienz und mit anti-TIF-IApS170/pS172 Antikörpern der Phosphorylierungsstatus von Serin 170 und 172 überprüft. Die angegebenen Prozentzahlen entsprechen jeweils dem Anteil eines Immunpräzipitationsansatzes, der im Western Blot verwendet wurde.

(B) Pol I und TIF-IA wurden aus HeLa-Zellkernextrakten immunpräzipitiert und die Präzipitationseffizienz wurde mit Antikörpern gegen RPA116 und TIF-IA in Western Blots nachgewiesen (Bahn 1-4). Der Phosphorylierungsstatus von direkt immunpräzipitiertem TIF-IA wurde mit dem Phosphorylierungsstatus von co-präzipitiertem TIF-IA mittels anti-TIF-IApS170/pS172 Antikörpern verglichen (Bahnen 5-8). Als Kontrolle für die Spezifität der Immunfällungen diente in A ein Ansatz mit einem Lysat aus Zellen ohne rekombinantes TIF-IA (mock) und in B ein Ansatz ohne Antikörper (mock-IP).

5 Diskussion

5.1 Das Guanin an Position -7 des rDNA-Promotors ist an der Bildung funktioneller Prä-Initiationskomplexe beteiligt

Die Bildung eines funktionellen Prä-Initiationskomplexes am rDNA-Promotor erfordert die Sequenz-spezifische Bindung von TIF-IB an die distale Domäne im *core promoter element* (CPE) (Skinner et al., 1984; Kishimoto et al., 1985; Clos et al., 1986a; Nagamine et al., 1987). Mutationen in dieser Domäne, insbesondere des Guanins an Position -16, beeinträchtigen die Bindung von TIF-IB an den rDNA-Promotor und führen folglich zu einer deutlich verringerten Transkriptionsaktivität. Dagegen hat die Mutation eines Guanins an Position -7 (G-7) keinen nachweisbaren Einfluß auf die Bindung von TIF-IB an den Promotor, vermindert aber erstaunlicherweise die Promotoraktivität in einem noch stärkeren Maße (Clos et al., 1986b; Nagamine et al., 1987).

Um die Funktion des Guanins an Position -7, aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* Transkriptionsstudien unter Verwendung von rDNA-Matrizen mit Wildtyp-Promotor oder mit G→A Transition an Position -7 oder -16 durchgeführt. Bei diesen Experimenten war zu berücksichtigen, daß es für die Rolle von G-7 bei der Transkriptionsinitiation prinzipiell zwei Erklärungsmöglichkeiten gibt:

(i) Neben TIF-IB ist noch ein anderer Faktor des basalen Pol I Prä-Initiationskomplexes an der Erkennung des CPE beteiligt.

(ii) Die proximale Domäne im CPE wird nicht von einem Faktor des basalen Transkriptionsapparats gebunden, sondern interagiert mit einem anderen Protein, das mit Pol I assoziiert ist.

Zunächst wurde die mögliche Bindung eines basalen Pol I Faktors untersucht. Da kürzlich gezeigt werden konnte, daß TIF-IB für die Ausbildung stabil mit dem rDNA-Promotor assoziierter Pol I Komplexe verantwortlich ist (Friedrich et al., 2005; Panov et al., 2006), wurde davon ausgegangen, daß der Bindungspartner der proximalen Domäne nur schwach mit dem Promotor assoziiert ist. Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, wurden mittels immobilisierter rDNA-Matrizen Promotor-gebundene Prä-Initiationskomplexe isoliert und vor dem Start der Transkription gewaschen. Bei diesem Verfahren werden transient an die rDNA-Matrize gebundene Faktoren zum Teil entfernt, woraus eine Verringerung der Pol I Aktivität resultiert (Panov et al., 2001). In den in Abschnitt 4.1.2 dargestellten Experimenten wurde dieser Effekt tatsächlich beim Wildtyp-Promotor sowie bei der G-16 Mutante, nicht aber bei der G-7 Mutante beobachtet.

Demnach wird die geringe Promotoraktivität der G-7 Mutante durch den Verlust von transient mit dem Promotor assoziierter Faktoren nicht weiter gehemmt. Dies impliziert wiederum, daß die G-7 Mutante einen dieser Faktoren nicht mehr bindet. Bei der Frage nach der Identität dieses Faktors können von dem basalen Pol I Prä-Initiationskomplex außer TIF-B theoretisch noch UBF, TIF-IA und Pol I in Betracht gezogen werden. Da eukaryotische RNA-Polymerasen keine Sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften haben, ist eine Bindung von Pol I an die proximale Domäne im Rahmen der Promotor-Erkennung äußerst unwahrscheinlich und wurde daher nicht weiter berücksichtigt. Bell et al. (1988) haben gezeigt, daß UBF nicht nur das UCE sondern auch das CPE bindet. Allerdings legen DNase I Schutzexperimente in der Studie nahe, daß sich die Interaktion von UBF mit dem CPE ebenfalls auf die distale Domäne beschränkt. Daher wurde in Abschnitt 4.1.3 eine Interaktion zwischen TIF-IA und der proximalen CPE-Domäne untersucht. Wie Transkriptionsanalysen mit Kernextrakten aus Rapamycin-behandelten Zellen zeigten, wird ohne funktionellem TIF-IA die Transkription an der G-7→A Matrize genauso wie am Wildtyp-Promotor komplett inhibiert. Folglich resultiert die ineffiziente Transkription an der G-7 Promotor-Mutante nicht aus einer von TIF-IA unabhängigen Rest-Aktivität, wird aber möglicherweise durch eine verminderte Bindung von TIF-IA an die proximale Domäne verursacht. Unter dieser Voraussetzung wäre es wahrscheinlich, daß die G-7 Mutante sensitiver als die Wildtyp-rDNA-Matrize gegenüber Depletierung von funktionellem TIF-IA in einem transkriptionell aktivem Kernextrakt ist. Im Gegensatz zu dieser Annahme wurde in solchen TIF-IA-Depletierungsexperimenten die Transkription an Matrizen mit Wildtyp- oder mutiertem Promotor in gleichem Maße gehemmt. Somit ist es unwahrscheinlich, daß bei der Bildung des Prä-Initiationskomplexes eine Interaktion zwischen TIF-IA und CPE stattfindet. Um diese Interaktion aber vollständig ausschließen zu können, müßten direkte DNA-Protein-Bindungsstudien, wie z.B. *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) oder Nuklease-Schutzexperimente, durchgeführt werden. Allerdings konnte in ersten EMSA-Versuchen mit rekombinantem TIF-IA und PCR-amplifizierten Fragmenten des rDNA-Promotors bisher keine DNA-Bindung von TIF-IA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Sieht man von einer möglichen Bindung der basalen Transkriptionsfaktoren an die proximale Domäne im CPE ab, so könnte auch die Rekrutierung einer anderen, für die Pol I Transkription essentiellen Aktivität über diesen Promotor-Abschnitt erfolgen. Eine solche Aktivität stellt die Proteinkinase CK2 dar, für die eine Assoziation mit dem Pol I Holoenzym aus Ratte, *Xenopus*, Brokkoli und Mensch gezeigt wurde (Hannan et al., 1999;

Albert et al., 1999; Saez-Vasquez et al., 2001; Panova et al., 2006, Lin et al., 2006). CK2 stabilisiert durch Phosphorylierung die Assoziation von UBF mit dem rDNA-Promotor und ist somit für eine effektive Re-Initiation der Transkription notwendig (Panova et al., 2006, Lin et al., 2006). Um zu überprüfen, ob CK2 oder ein anderes, für die Re-Initiation benötigtes Protein mit der proximalen Domäne im CPE interagiert, wurde die Aktivität der G-7 Promotormutante in *single round*-Transkriptionen untersucht (Abschnitt 4.1.4). Hierbei stellte sich heraus, daß die G-7 Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Promotor ähnlich wie unter normalen Transkriptionsbedingungen inhibiert ist. Somit wird die verminderte Transkriptionsaktivität der Mutante nicht durch eine Inhibition der Re-Initiation verursacht. Folglich ist davon auszugehen, daß die für die Re-Initiation benötigten Faktoren nicht die proximale Domäne des rDNA-Promotor binden.

In den letzten Jahren wurden einige Faktoren entdeckt, die eine Rolle bei der Pol II-Transkription spielen und ebenfalls eine Funktion bei der Pol I-Transkription inne haben. Zu diesen Faktoren gehören der basale Pol II-spezifische Faktor TFIID (Iben et al., 2002) sowie im Zellkern lokalisiertes Aktin und Myosin I (NMI) (Philimonenko et al., 2004; Percipalle et al., 2006). TFIID, Aktin und NMI interagieren mit Komponenten des Pol I Apparats und sind für die effiziente Transkription einer rDNA-Matrize *in vitro* notwendig. Da alle drei Faktoren in abortiven Transkriptionsanalysen für die Synthese der ersten Nukleotide nicht benötigt werden (Iben et al., 2002; Philimonenko et al., 2004; Percipalle et al., 2006), sind sie an einem Schritt nach der Transkriptionsinitiation beteiligt. Für Aktin und NMI konnte *in vivo* eine Assoziation mit rDNA gezeigt werden. Es ist aber ebenso wie für TFIID nicht klar, ob ein direkter Kontakt mit dem Promotor erfolgt. Um zu untersuchen, ob Aktin, NMI oder TFIID mit der proximalen Domäne im CPE interagieren, wurden abortive Transkriptionsanalysen mit der G-7 Mutante durchgeführt. Hätte die Mutante keinen Defekt in der abortiven Transkription aufgewiesen, wäre die proximale Domäne als mögliche Bindestelle für die genannten Faktoren in Frage gekommen. Allerdings zeigen die in Abschnitt 4.1.5 präsentierten Daten, daß die Mutante ähnlich wie unter normalen Transkriptionsbedingungen auch in der abortiven Transkription inhibiert ist. Demzufolge ist die proximale Domäne an einem Schritt vor oder bei der Transkriptionsinitiation beteiligt und interagiert nicht mit Aktin, NMI oder TFIID.

Die in Abschnitt 4.1 durchgeführten Experimente legen die Existenz eines Faktors, der an die proximale Domäne im CPE bindet, nahe. Zwar konnte dieser Faktor nicht identifiziert werden, aber es wurden mehrere Komponenten des Pol I Holoenzym als Bindungspartner der proximalen Domäne ausgeschlossen. Darüber hinaus konnte die

Funktion der proximalen Domäne bzw. des mit ihr interagierenden Proteins auf einen Schritt vor oder bei der Transkriptionsinitiation eingegrenzt werden. Um den molekularen Mechanismus, an dem die proximale Domäne beteiligt ist, weiter aufzuklären, sind zusätzliche Transkriptionsanalysen unter Verwendung der G-7 Promotor-Mutante notwendig. So könnte mit teilweise aufgeschmolzenen, Heteroduplex-Derivaten des rDNA-Promotors überprüft werden, ob die Guaninbase an Position -7 für den Übergang des geschlossenen Initiationskomplexes in einen offenen Komplex notwendig ist. Ferner könnte zur direkten Identifizierung des Faktors, der mit der proximalen Domäne interagiert, ein Promotor-Derivat mit einem photoreaktivem Nukleotid-Analogon an Position -7 verwendet werden. Nach Inkubation dieser Matrize mit einem transkriptionell aktiven Kernextrakt könnte durch Bestrahlung mit UV-Licht der assoziierte Faktor kovalent an die proximale Domäne gebunden und dadurch markiert werden.

5.2 Die rDNA-Transkription wird durch CK2-vermittelte Phosphorylierung von TIF-IA nach Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes gesteuert

TIF-IA wurde ursprünglich als Aktivität, die die wachstumsabhängige Regulation der zellulären rRNA Synthese vermittelt, beschrieben (Buttgereit et al., 1985). Bei der weiteren Charakterisierung von TIF-IA postulierten Schnapp et al. (1990), daß TIF-IA mittels Phosphorylierung durch CK2 in seiner Aktivität reguliert wird. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese entdeckten Schlosser et al. (2002) durch Massenspektrometrische Analysen zwei Phospho-Serine an den Positionen 170 und 172 in TIF-IA, die jeweils in einem Konsensus-Erkennungsmotiv für CK2 liegen. Aufgrund dieser Daten wurde die CK2-abhängige Phosphorylierung von TIF-IA im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Tatsächlich führt die Behandlung von Zellen mit einem spezifischen CK2-Inhibitor zu einer Hemmung sowohl der 45S rRNA Synthese als auch der TIF-IA Aktivität (Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2). Um nachzuweisen, daß die Inaktivierung von TIF-IA auf die Inhibierung der Phosphorylierung von Serin 170 und 172 durch CK2 zurückzuführen ist, wurden *in vitro* Phosphorylierungsexperimente durchgeführt (Abschnitt 4.2.3). Hierfür wurde eine TIF-IA-Mutante (TIF-IAS170A/S172A) hergestellt, die theoretisch nicht mehr durch CK2 phosphoryliert werden sollte. Allerdings wurde nicht nur TIF-IA sondern auch TIF-IAS170A/S172A, wenn auch mit geringerer Effizienz, durch gereinigte CK2 phosphoryliert. Phospho-Peptid-Analysen von *in vivo* mit ³²P-Orthophosphat markiertem TIF-IA zeigten aber, daß zellulärer TIF-IA nur an Serin 170 und 172 durch CK2 phosphoryliert wird. Darüber hinaus war durch die Mutation von Serin 170 und 172 kein

Effekt auf die Phosphorylierung von TIF-IA durch andere Kinasen zu beobachten. Da die bisher bekannten Phosphorylierungen die Aktivität von TIF-IA in Abhängigkeit des physiologischen Status der Zelle regulieren und einander beeinflussen (Zhao et al., 2003; Mayer et al., 2004; Mayer et al., 2005), war diese Beobachtung ein erster Hinweis darauf, daß TIF-IA durch CK2 in einem anderen funktionellen Kontext, der nicht der wachstumsabhängigen Kontrolle unterliegt, reguliert wird.

Um die Rolle der CK2-abhängigen Phosphorylierung bei der Regulation von TIF-IA gezielt zu untersuchen, wurden funktionelle Analysen unter Verwendung der TIF-IAS170A/S172A-Mutante durchgeführt. Mit Hilfe von Pol I Reporteranalysen in HEK293T Zellen sowie im zellfreien Transkriptionssystem wurde nachgewiesen, daß TIF-IA durch Inhibierung der Phosphorylierung von Serin 170 und 172 inaktiviert wird (Abschnitt 4.2.4). Diese Resultate stimmen mit dem beobachteten Verlust der TIF-IA Aktivität nach Inhibierung von CK2 überein und zeigen, daß Serin 170 und 172 neben Serin 633 und 649 (Zhao et al., 2003) sowie Serin 44 (Mayer et al., 2004) essentielle Phosphorylierungsstellen in TIF-IA sind. Im Gegensatz zu S633A-, S649A- und S44A-Mutanten wird durch TIF-IAS170A/S172A sowohl *in vivo* als auch *in vitro* noch eine schwache Stimulation der Pol I Transkription erzielt. Da diese Beobachtung den Schluß zuläßt, daß TIF-IAS170A/S172A eine geringe Rest-Aktivität aufweist, wurde untersucht, inwieweit durch die Überexpression der Mutante der Verlust von endogenem TIF-IA kompensiert werden kann. In Hefezellen führt die Deletion des Gens für den zu TIF-IA homologen Faktor Rrn3p zum Verlust der Lebensfähigkeit (Yamamoto et al., 1996). Ebenso sind Mäuse, die homozygot für ein *TIF-IA* Nullallel sind, nicht lebensfähig und sterben in der Embryonalentwicklung spätestens an Tag 9,5 (Yuan et al., 2006). Darüber hinaus bewirkt die genetische Inaktivierung von TIF-IA in Fibroblasten aus Mausembryonen (*TIF-IA*^{fl/fl}-MEFs) nicht nur den Verlust der Pol I-Transkriptionsaktivität, sondern führt auch zur Auflösung der nukleolären Strukturen und zur Arretierung der Zellen in der G₀- bzw. G₁-Phase des Zellzyklus (Yuan et al., 2006). Durch Verwendung von *TIF-IA*^{fl/fl}-MEFs konnte gezeigt werden, daß TIF-IAS170A/S172A endogenen TIF-IA funktionell nicht ersetzen kann (Abschnitt 4.2.5). Trotz Expression von TIF-IAS170A/S172A wird nach Inaktivierung von endogenem TIF-IA sowohl die Auflösung der Nukleolen als auch eine Inhibierung der Zellproliferation induziert. Dagegen sind *TIF-IA*^{-/-}-MEFs, die Wildtyp-TIF-IA ektopisch exprimieren, im Wachstum nicht beeinträchtigt und weisen normale nukleoläre Strukturen auf. Diese Ergebnisse belegen eindeutig die funktionelle Relevanz der CK2-abhängigen Phosphorylierung von TIF-IA. Darüber hinaus

lassen die Experimente, bei denen erstmalig rekombinanter TIF-IA in einem genetischen *TIF-IA*^{-/-}-Hintergrund in Säugerzellen exprimiert wurde, die Schlußfolgerungen zu, daß die Zellproliferation und die Integrität des Nukleolus von transkriptionell aktivem TIF-IA abhängen. Während in der Studie von Yuan et al. (2005) der Verlust von zellulärem TIF-IA untersucht wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zwischen Zellen ohne TIF-IA und Zellen mit transkriptionell inaktivem TIF-IA differenziert werden. Da es in beiden Fällen zur Auflösung der nukleolären Strukturen und zur Arretierung der Zellen im Zellzyklus kommt, läßt sich folgern, daß TIF-IA durch Stimulation der Pol I Transkription für die Integrität der Nukleolen sowie für die Zellproliferation entscheidend ist. Eine strukturelle Rolle von TIF-IA bei der Organisation des Nukleolus, wie es beispielsweise für UBF gezeigt wurde (Mais et al., 2005; Wright et al., 2006), ist demnach auszuschließen.

Nachdem nachgewiesen wurde, daß die CK2-vermittelte Phosphorylierung für die Funktion von TIF-IA essentiell ist, stellte sich die Frage, welcher molekulare Mechanismus dieser Regulation zugrunde liegt. Wie mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt wurde, interagiert TIF-IAS170A/S172A im Vergleich zu Wildtyp-TIF-IA verstärkt mit Pol I, während die Interaktion mit TIF-IB nicht beeinflusst wird (Abschnitt 4.2.6). Eine stärkere Bindung von rekombinantem und endogenem TIF-IA an Pol I wurde auch durch Inhibition von CK2 bewirkt. Somit verringert die Phosphorylierung von Serin 170 und 172 die Assoziation zwischen TIF-IA und Pol I. Um diesen negativen Effekt der CK2-vermittelten Phosphorylierung auf die Interaktion von TIF-IA und Pol I direkt nachzuweisen, wurden Antikörper hergestellt, die spezifisch die Phospho-Serine 170 und 172 in TIF-IA erkennen. Mit Hilfe dieser Antikörper wurde der Phosphorylierungsstatus von Serin 170 und 172 in freiem und Pol I-assoziiertem TIF-IA untersucht (Abschnitt 4.2.7). In Übereinstimmung mit den Interaktionsstudien nach Überexpression von TIF-IAS170A/S172A und nach Inhibition von CK2 sind Serin 170 und 172 nur in freiem TIF-IA phosphoryliert. Pol I-assoziiertes TIF-IA weist dagegen keine Phosphorylierung durch CK2 auf. Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung anderer essentieller Phosphorylierungsstellen in TIF-IA entweder notwendig für die Interaktion von TIF-IA und Pol I, wie z.B. bei Serin 649 (Philimonenko et al., 2004), oder hat, wie im Fall von Serin 44, keinen Effekt auf diese Interaktion (Mayer et al., 2004). Da die Bildung funktioneller Prä-Initiationskomplexe die Interaktion von TIF-IA und Pol I voraussetzt, ist es erstaunlich, daß die Phosphorylierung von TIF-IA durch CK2 einerseits diesen Prozeß inhibiert, andererseits für eine aktive Pol I

Transkription notwendig ist. Folglich stellt sich die Frage, in welchem Zusammenhang die CK2-abhängige Regulation von TIF-IA erfolgt. Die Ergebnisse der Phospho-Peptid-Analysen wiesen bereits darauf hin, daß CK2 die Aktivität von TIF-IA nicht in Abhängigkeit des physiologischen Zustands der Zelle reguliert. Zu dieser Vermutung paßt auch, daß CK2 kein Bestandteil eines bestimmten Signaltransduktionswegs ist, sondern eine konstitutive Aktivität aufweist (Pinna, 2003). Ähnlich wie bei der Phosphorylierung des Pol III-spezifischen Faktors TFIIB (Ghavidel und Schultz, 1997; Ghavidel et al., 1999; Ghavidel und Schultz, 2001) und des Pol II-spezifischen Faktors TFIID (Sekiguchi et al., 1991; Lewis et al., 2005) ist anzunehmen, daß CK2 durch Phosphorylierung von TIF-IA den Transkriptionsprozeß an sich reguliert. Diese transkriptionsgekoppelte Regulation findet gemäß der in dieser Arbeit präsentierten Daten bei einem Schritt nach der Initiation statt. Da bekannt ist, daß eine Dissoziation des TIF-IA-Pol I Komplexes nach der Synthese der ersten 30-40 Nukleotiden erfolgt (Brun et al., 1994; Bier et al., 2004), könnte dieser Prozeß möglicherweise durch CK2 induziert werden. Übereinstimmend mit dieser Hypothese ist auch die Beobachtung, daß TIF-IA nach der Dissoziation von elongierenden Pol I Komplexen inaktiviert wird (Hirschler-Laszkiewicz et al., 2003), da eine Phosphorylierung an Serin 170 und 172 die Inkorporation von TIF-IA in den Prä-Initiationskomplex verhindert. Somit könnte die CK2-abhängige Phosphorylierung von TIF-IA zum einen für die Elongation notwendig sein, zum anderen könnte sie an dem *recycling* von Pol I und TIF-IA für die Re-Initiation der Transkription beteiligt sein. Dies würde allerdings eine anschließende De-Phosphorylierung von Serin 170 und 172 zur Regeneration der TIF-IA Aktivität implizieren. Interessanterweise zeigen erst kürzlich veröffentlichte Daten, daß CK2 in der Tat die Re-Initiation der Pol I Transkription durch die Phosphorylierung von UBF reguliert (Panova et al., 2006, Lin et al., 2006). Demnach ist es denkbar, daß CK2 das Zusammenspiel einzelner Komponenten des Pol I Transkriptionsapparats bei der Re-Initiation kontrolliert.

Vorausgesetzt, daß CK2 die Dissoziation zwischen TIF-IA und Pol I in einem Post-Initiationsschritt vermittelt, würde die Inhibierung der CK2-abhängigen Phosphorylierung von TIF-IA zur Arretierung elongierender Pol I Komplexe führen und somit die Mobilität von Pol I im Nukleolus einschränken. Um diese Hypothese experimentell nachzuweisen, wurden in Zusammenarbeit mit Mirek Dundr von der *Chicago Medical School* in Illinois, USA *fluorescent recovery after photobleaching* (FRAP) Experimente durchgeführt. Hierbei wurde die Mobilität von Pol I im Nukleolus nach Inhibierung von CK2 oder Expression von TIF-IAS170A/S172A bestimmt. In der

Tat kann nach Behandlung von Zellen mit einem CK2-Inhibitor eine verringerte Mobilität von Pol I und TIF-IA festgestellt werden (M. Dundr, persönliche Mitteilung). Eine ähnliche Verlangsamung der Pol I Kinetik wurde nach Überexpression von TIF-IA^{S170A/S172A} beobachtet. Damit bestätigen die FRAP-Experimente die vermutete Rolle von CK2 bei der Regulation der Dissoziation zwischen TIF-IA und Pol I während der Elongationphase der rDNA-Transkription.

Die in Abschnitt 4.2 präsentierten Daten zeigen, daß CK2 die Serinreste 170 und 172 in TIF-IA phosphoryliert und damit entscheidend an der Regulation der Pol I Transkription beteiligt ist. Obwohl diese Phosphorylierung die Bildung von Prä-Initiationskomplexen inhibiert, ist sie wahrscheinlich das ausschlaggebende Signal für die Dissoziation zwischen TIF-IA und elongierender Pol I und daher essentiell für die 45S rRNA Synthese. In Abb. 5.1 ist die postulierte Regulation der Pol I Transkription durch CK2 schematisch dargestellt.

Für die weitere Aufklärung dieses Regulationsmechanismus stellen sich folgende Fragen:

(i) Wie kann CK2, die bereits mit initiationskompetenten Pol I Komplexen assoziiert ist (Panova et al., 2006, Lin et al., 2006), zwischen TIF-IA im Prä-Initiationskomplex und im elongierenden Komplex unterscheiden? Möglicherweise sind hierfür strukturelle Veränderungen des Pol I Komplex, die mit dem Übergang von Initiation zu Elongation einhergehen, verantwortlich. Es wäre denkbar, daß die Interaktion zwischen TIF-IA und PAF67 (Seither et al., 2001; Yuan et al., 2002) nach der Initiation aufgehoben wird und somit die CK2-Phosphorylierungstellen in TIF-IA zugänglich werden.

(ii) Was passiert mit TIF-IA nach der Phosphorylierung durch CK2? Bisher ist nicht bekannt, ob und wie TIF-IA nach erfolgter Initiation wieder in eine initiationskompetente Form überführt wird. Allerdings zeigen Transkriptionsanalysen mit immobilisierten rDNA-Matrizen, daß isolierte Prä-Initiationskomplexe zu mehreren sukzessiven Transkriptionszyklen fähig sind (Panov et al., 2001; Abschnitt 4.1.2). Folglich ist ein *recycling* von TIF-IA wahrscheinlich, das im einfachsten Fall durch eine De-Phosphorylierung von Serin 170 und 172 erfolgen könnte. Die Identifizierung der entsprechenden Phosphatase wäre ein weiterer wichtiger Schritt zur Aufklärung der transkriptionsgekoppelten Regulation von TIF-IA.

(iii) Inwieweit ist die CK2-abhängige Regulation der Assoziation von TIF-IA mit Pol I ein universell verbreiteter Mechanismus in Eukaryoten? TIF-IA ist zwischen Säugern

und Hefe konserviert und kann den homologen Faktor Rrn3p in Hefe funktionell komplementieren (Moorefield et al., 2000). Obwohl auch in Hefe eine Dissoziation von Pol I und Rrn3p nach der Initiation erfolgt (Bier et al., 2004), sind die CK2-Phosphorylierungsstellen zwischen TIF-IA und Rrn3p nicht konserviert. Des Weiteren konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigen, daß die kovalente Verknüpfung von Pol I und Rrn3p keine Inhibierung der rRNA Synthese zur Folge hat (Laferte et al., 2006). Demnach ist anzunehmen, daß die Notwendigkeit für eine transkriptionsgekoppelte Dissoziation von TIF-IA und Pol I im Rahmen der Evolution erst bei der Entwicklung höherer Eukaryoten aufgetreten ist. Hierfür spricht auch, daß in Säugern der Pol I Transkriptionsapparat ein sehr dynamischer Komplex ist, der nach jedem Transkriptionszyklus auseinanderfällt und für die Re-Initiation wieder neu gebildet werden muß (Dundr et al., 2002). In Hefe bleibt hingegen der Pol I Komplex über mehrere Transkriptionszyklen hinweg stabil assoziiert (Schneider und Nomura, 2004). Um eindeutig nachzuweisen, daß eine transkriptionsgekoppelte Dissoziation von TIF-IA und Pol I essentiell für die 45S rRNA Synthese ist, wird derzeit analog zu dem Rrn3p-Pol I Konstrukt (Laferte et al., 2006) von unserem Labor in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Nouria Hernandez (*Center for Integrative Genomics*, Lausanne) ein TIF-IA-Pol I Fusionsprotein in Mensch- und Mauszellen etabliert und funktionell charakterisiert.

Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurde ein Beitrag zum Verständnis der transkriptionsgekoppelten Regulation von TIF-IA geleistet. Es ist anzunehmen, daß CK2 eine wichtige Rolle bei der Regeneration von TIF-IA und Pol I für die Re-Initiation spielt und darüber hinaus auch für eine produktive Elongation notwendig ist. Mit Hinblick darauf, daß die hohe Transkriptionsrate von Pol I ein effizientes *recycling* der Initiationsfaktoren erfordert, ist die Regulation von TIF-IA im Rahmen des Pol I Transkriptionszyklus vermutlich essentiell, um den Bedarf der Zelle an rRNA zu gewährleisten.

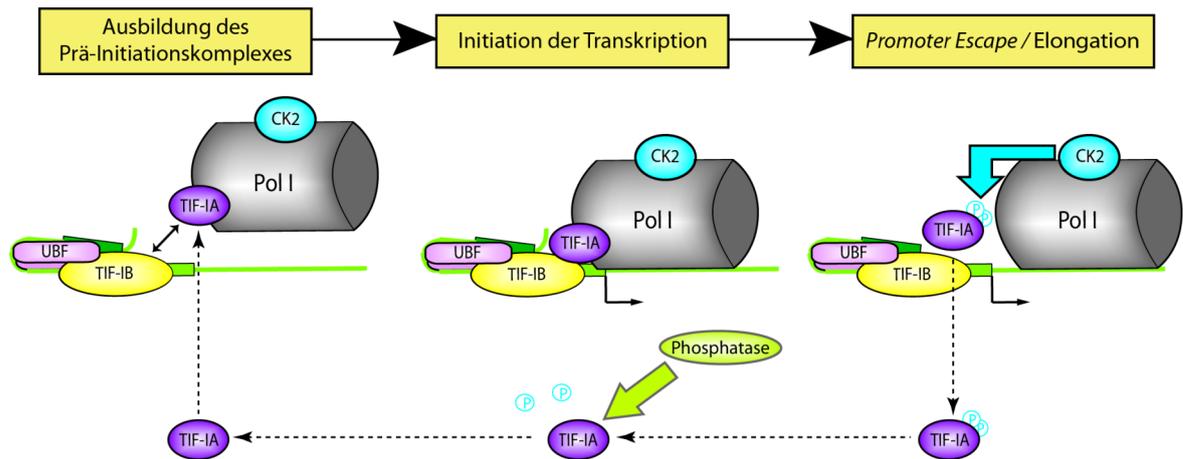


Abb. 5.1: Modell der Funktion der CK2-abhängigen Phosphorylierung von TIF-IA im Prozeß der rDNA-Transkription.

Die bereits mit dem initiationskompetenten Pol I Komplex assoziierte CK2 phosphoryliert TIF-IA bei dem *Promotor-Escape* oder in der frühen Elongationsphase und induziert die Dissoziation von TIF-IA vom Elongationskomplex. Dadurch wird eine produktive Transkriptionselongation ermöglicht und TIF-IA kann nach Revertierung der CK2-vermittelten Phosphorylierung durch eine bisher unbekannte Phosphatase wieder in einen Prä-Initiationskomplex inkorporiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Albert, A.C., Denton, M., Kermekchiev, M., and Pikaard, C.S. 1999. Histone acetyltransferase and protein kinase activities copurify with a putative *Xenopus* RNA polymerase I holoenzyme self-sufficient for promoter-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **19**(1): 796-806.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., ed. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
- Bartsch, I., Schoneberg, C., and Grummt, I. 1988. Purification and characterization of TTFI, a factor that mediates termination of mouse ribosomal DNA transcription. *Mol Cell Biol* **8**(9): 3891-3897.
- Bazett-Jones, D.P., Leblanc, B., Herfort, M., and Moss, T. 1994. Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**(5162): 1134-1137.
- Beckmann, H., Chen, J.L., O'Brien, T., and Tjian, R. 1995. Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. *Science* **270**(5241): 1506-1509.
- Bell, S.P., Jantzen, H.M., and Tjian, R. 1990. Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity. *Genes Dev* **4**(6): 943-954.
- Bell, S.P., Learned, R.M., Jantzen, H.M., and Tjian, R. 1988. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* **241**(4870): 1192-1197.
- Bier, M., Fath, S., and Tschochner, H. 2004. The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Lett* **564**(1-2): 41-46.
- Bodem, J., Dobreva, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M., and Grummt, I. 2000. TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep* **1**(2): 171-175.
- Bradsher, J., Auriol, J., Proietti de Santis, L., Iben, S., Vonesch, J.L., Grummt, I., and Egly, J.M. 2002. CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell* **10**(4): 819-829.
- Brun, R.P., Ryan, K., and Sollner-Webb, B. 1994. Factor C*, the specific initiation component of the mouse RNA polymerase I holoenzyme, is inactivated early in the transcription process. *Mol Cell Biol* **14**(7): 5010-5021.
- Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H.H., Pointu, H., Olsen, B.B., Cochet, C., Issinger, O.G., and Boldyreff, B. 2003. Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **23**(3): 908-915.

- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* **11**(22): 3020-3031.
- Burnett, G. and Kennedy, E.P. 1954. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* **211**(2): 969-980.
- Burnett, P.E., Barrow, R.K., Cohen, N.A., Snyder, S.H., and Sabatini, D.M. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4): 1432-1437.
- Buttgereit, D., Pflugfelder, G., and Grummt, I. 1985. Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA). *Nucleic Acids Res* **13**(22): 8165-8180.
- Carles, C., and M. Riva. 1998. in *Transcription of ribosomal RNA genes by eukaryotic RNA polymerase I*. (Paule, M.R., ed.), pp 9-38, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Cavanaugh, A.H., Hirschler-Laszkiwicz, I., Hu, Q., Dunder, M., Smink, T., Misteli, T., and Rothblum, L.I. 2002. Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis. *J Biol Chem* **277**(30): 27423-27432.
- Channavajhala, P. and Seldin, D.C. 2002. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene* **21**(34): 5280-5288.
- Clos, J., Buttgereit, D., and Grummt, I. 1986a. A purified transcription factor (TIF-IB) binds to essential sequences of the mouse rDNA promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(3): 604-608.
- Clos, J., Normann, A., Ohrlein, A., and Grummt, I. 1986b. The core promoter of mouse rDNA consists of two functionally distinct domains. *Nucleic Acids Res* **14**(19): 7581-7595.
- Comai, L. 2004. Mechanism of RNA polymerase I transcription. *Adv Protein Chem* **67**: 123-155.
- Comai, L., Zomerdijk, J.C., Beckmann, H., Zhou, S., Admon, A., and Tjian, R. 1994. Reconstitution of transcription factor SL1: exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science* **266**(5193): 1966-1972.
- Cramer, P. 2002. Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* **12**(1): 89-97.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**(5): 1475-1489.
- Dunder, M., Hoffmann-Rohrer, U., Hu, Q., Grummt, I., Rothblum, L.I., Phair, R.D., and Misteli, T. 2002. A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science* **298**(5598): 1623-1626.

- Eberhard, D., Tora, L., Egly, J.M., and Grummt, I. 1993. A TBP-containing multiprotein complex (TIF-IB) mediates transcription specificity of murine RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* **21**(18): 4180-4186.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and White, F.M. 2002. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **20**(3): 301-305.
- Filhol, O., Martiel, J.L., and Cochet, C. 2004. Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep* **5**(4): 351-355.
- Friedrich, J.K., Panov, K.I., Cabart, P., Russell, J., and Zomerdijk, J.C. 2005. TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *J Biol Chem* **280**(33): 29551-29558.
- Gerber, D.A., Souquere-Besse, S., Puvion, F., Dubois, M.F., Bensaude, O., and Cochet, C. 2000. Heat-induced relocalization of protein kinase CK2. Implication of CK2 in the context of cellular stress. *J Biol Chem* **275**(31): 23919-23926.
- Ghavidel, A., Hockman, D.J., and Schultz, M.C. 1999. A review of progress towards elucidating the role of protein kinase CK2 in polymerase III transcription: regulation of the TATA binding protein. *Mol Cell Biochem* **191**(1-2): 143-148.
- Ghavidel, A. and Schultz, M.C. 1997. Casein kinase II regulation of yeast TFIIIB is mediated by the TATA-binding protein. *Genes Dev* **11**(21): 2780-2789.
- Ghavidel, A. and Schultz, M.C. 2001. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell* **106**(5): 575-584.
- Glover, C.V., 3rd. 1998. On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **59**: 95-133.
- Gonzalez, I.L. and Sylvester, J.E. 1995. Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* **27**(2): 320-328.
- Grozdanov, P., Georgiev, O., and Karagyozov, L. 2003. Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* **82**(6): 637-643.
- Grummt, I. 1981a. Mapping of a mouse ribosomal DNA promoter by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* **9**(22): 6093-6102.
- Grummt, I. 1981b. Specific transcription of mouse ribosomal DNA in a cell-free system that mimics control in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(2): 727-731.
- Grummt, I. 1982. Nucleotide sequence requirements for specific initiation of transcription by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(22): 6908-6911.

- Grummt, I. 1999. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 109-154.
- Grummt, I. 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* **17**(14): 1691-1702.
- Grummt, I., Kuhn, A., Bartsch, I., and Rosenbauer, H. 1986a. A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis. *Cell* **47**(6): 901-911.
- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U., and Ohrlein, A. 1986b. A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell* **45**(6): 837-846.
- Grummt, I., Roth, E., and Paule, M.R. 1982. Ribosomal RNA transcription in vitro is species specific. *Nature* **296**(5853): 173-174.
- Grummt, I. and Skinner, J.A. 1985. Efficient transcription of a protein-coding gene from the RNA polymerase I promoter in transfected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(3): 722-726.
- Guerra, B. and Issinger, O.G. 1999. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**(2): 391-408.
- Guo, C., Yu, S., Davis, A.T., and Ahmed, K. 1999. Nuclear matrix targeting of the protein kinase CK2 signal as a common downstream response to androgen or growth factor stimulation of prostate cancer cells. *Cancer Res* **59**(5): 1146-1151.
- Haltiner, M.M., Smale, S.T., and Tjian, R. 1986. Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol Cell Biol* **6**(1): 227-235.
- Hanada, K., Song, C.Z., Yamamoto, K., Yano, K., Maeda, Y., Yamaguchi, K., and Muramatsu, M. 1996. RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *Embo J* **15**(9): 2217-2226.
- Hannan, R.D., Hempel, W.M., Cavanaugh, A., Arino, T., Dimitrov, S.I., Moss, T., and Rothblum, L. 1998. Affinity purification of mammalian RNA polymerase I. Identification of an associated kinase. *J Biol Chem* **273**(2): 1257-1267.
- Hawley, D.K. and Roeder, R.G. 1985. Separation and partial characterization of three functional steps in transcription initiation by human RNA polymerase II. *J Biol Chem* **260**(13): 8163-8172.
- Heix, J. and Grummt, I. 1995. Species specificity of transcription by RNA polymerase I. *Curr Opin Genet Dev* **5**(5): 652-656.

- Heix, J., Zomerdijk, J.C., Ravanpay, A., Tjian, R., and Grummt, I. 1997. Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation factor TIF-IB/SL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1733-1738.
- Henderson, A.S., Warburton, D., and Atwood, K.C. 1972. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(11): 3394-3398.
- Hirschler-Laszkiewicz, I., Cavanaugh, A.H., Mirza, A., Lun, M., Hu, Q., Smink, T., and Rothblum, L.I. 2003. Rrn3 becomes inactivated in the process of ribosomal DNA transcription. *J Biol Chem* **278**(21): 18953-18959.
- Hitomi, M. and Stacey, D.W. 1999. Cyclin D1 production in cycling cells depends on ras in a cell-cycle-specific manner. *Curr Biol* **9**(19): 1075-1084.
- Hockman, D.J. and Schultz, M.C. 1996. Casein kinase II is required for efficient transcription by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **16**(3): 892-898.
- Hu, P., Samudre, K., Wu, S., Sun, Y., and Hernandez, N. 2004. CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA polymerase III transcription repression. *Mol Cell* **16**(1): 81-92.
- Hu, P., Wu, S., and Hernandez, N. 2003. A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. *Mol Cell* **12**(3): 699-709.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P., Egly, J.M., and Grummt, I. 2002. TFIIF plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* **109**(3): 297-306.
- Jansa, P., Burek, C., Sander, E.E., and Grummt, I. 2001. The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* **29**(2): 423-429.
- Jansa, P. and Grummt, I. 1999. Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Mol Gen Genet* **262**(3): 508-514.
- Jansa, P., Mason, S.W., Hoffmann-Rohrer, U., and Grummt, I. 1998. Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *Embo J* **17**(10): 2855-2864.
- Jantzen, H.M., Admon, A., Bell, S.P., and Tjian, R. 1990. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* **344**(6269): 830-836.
- Jantzen, H.M., Chow, A.M., King, D.S., and Tjian, R. 1992. Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev* **6**(10): 1950-1963.

- Johnston, I.M., Allison, S.J., Morton, J.P., Schramm, L., Scott, P.H., and White, R.J. 2002. CK2 forms a stable complex with TFIIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells. *Mol Cell Biol* **22**(11): 3757-3768.
- Jones, M.H., Learned, R.M., and Tjian, R. 1988. Analysis of clustered point mutations in the human ribosomal RNA gene promoter by transient expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(3): 669-673.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 240-246.
- Kassavetis, G.A., Blanco, J.A., Johnson, T.E., and Geiduschek, E.P. 1992. Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III. *J Mol Biol* **226**(1): 47-58.
- Kishimoto, T., Nagamine, M., Sasaki, T., Takakusa, N., Miwa, T., Kominami, R., and Muramatsu, M. 1985. Presence of a limited number of essential nucleotides in the promoter region of mouse ribosomal RNA gene. *Nucleic Acids Res* **13**(10): 3515-3532.
- Kovelman, R. and Roeder, R.G. 1990. Sarkosyl defines three intermediate steps in transcription initiation by RNA polymerase III: application to stimulation of transcription by E1A. *Genes Dev* **4**(4): 646-658.
- Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C., and Chedin, S. 2006. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev* **20**(15): 2030-2040.
- Learned, R.M., Learned, T.K., Haltiner, M.M., and Tjian, R.T. 1986. Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell* **45**(6): 847-857.
- Learned, R.M. and Tjian, R. 1982. In vitro transcription of human ribosomal RNA genes by RNA polymerase I. *J Mol Appl Genet* **1**(6): 575-584.
- Lewis, B.A., Kim, T.K., and Orkin, S.H. 2000. A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7172-7177.
- Lewis, B.A., Sims, R.J., 3rd, Lane, W.S., and Reinberg, D. 2005. Functional characterization of core promoter elements: DPE-specific transcription requires the protein kinase CK2 and the PC4 coactivator. *Mol Cell* **18**(4): 471-481.
- Lin, C.Y., Navarro, S., Reddy, S., and Comai, L. 2006. CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic Acids Res* **34**(17): 4752-4766.
- Litchfield, D.W. 2003. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**(Pt 1): 1-15.

- Luse, D.S. and Jacob, G.A. 1987. Abortive initiation by RNA polymerase II in vitro at the adenovirus 2 major late promoter. *J Biol Chem* **262**(31): 14990-14997.
- Mais, C., Wright, J.E., Prieto, J.L., Raggett, S.L., and McStay, B. 2005. UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev* **19**(1): 50-64.
- Marin, O., Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G., and Pinna, L.A. 1986. Site specificity of casein kinase-2 (TS) from rat liver cytosol. A study with model peptide substrates. *Eur J Biochem* **160**(2): 239-244.
- Mason, S.W., Sander, E.E., and Grummt, I. 1997. Identification of a transcript release activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *Embo J* **16**(1): 163-172.
- Mayer, C., Bierhoff, H., and Grummt, I. 2005. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* **19**(8): 933-941.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. 2004. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* **18**(4): 423-434.
- McClure, W.R., Cech, C.L., and Johnston, D.E. 1978. A steady state assay for the RNA polymerase initiation reaction. *J Biol Chem* **253**(24): 8941-8948.
- Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G., Chessa, G., and Pinna, L.A. 1984. Synthetic peptides including acidic clusters as substrates and inhibitors of rat liver casein kinase TS (type-2). *J Biol Chem* **259**(23): 14576-14579.
- Meggio, F. and Pinna, L.A. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* **17**(3): 349-368.
- Milkereit, P. and Tschochner, H. 1998. A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *Embo J* **17**(13): 3692-3703.
- Miller, G., Panov, K.I., Friedrich, J.K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I., and Zomerdijk, J.C. 2001. hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *Embo J* **20**(6): 1373-1382.
- Miller, K.G., Tower, J., and Sollner-Webb, B. 1985. A complex control region of the mouse rRNA gene directs accurate initiation by RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* **5**(3): 554-562.
- Moorefield, B., Greene, E.A., and Reeder, R.H. 2000. RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4724-4729.
- Moss, T., Mitchelson, K., and de Winter, R. 1985. The promotion of ribosomal transcription in eukaryotes. *Oxf Surv Eukaryot Genes* **2**: 207-250.

- Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I., and Voit, R. 2001. Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J* **20**(6): 1353-1362.
- Nagamine, M., Kishimoto, T., Aono, J., Kato, H., Kominami, R., and Muramatsu, M. 1987. Sequestration analysis for RNA polymerase I transcription factors with various deletion and point mutations reveals different functional regions of the mouse rRNA gene promoter. *Mol Cell Biol* **7**(4): 1486-1495.
- O'Sullivan, A.C., Sullivan, G.J., and McStay, B. 2002. UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* **22**(2): 657-668.
- Pagano, M.A., Meggio, F., Ruzzene, M., Andrzejewska, M., Kazimierczuk, Z., and Pinna, L.A. 2004. 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* **321**(4): 1040-1044.
- Panov, K.I., Friedrich, J.K., Russell, J., and Zomerdijk, J.C. 2006a. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *Embo J* **25**(14): 3310-3322.
- Panov, K.I., Friedrich, J.K., and Zomerdijk, J.C. 2001. A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **21**(8): 2641-2649.
- Panov, K.I., Panova, T.B., Gadal, O., Nishiyama, K., Saito, T., Russell, J., and Zomerdijk, J.C. 2006b. RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. *Mol Cell Biol* **26**(14): 5436-5448.
- Panova, T.B., Panov, K.I., Russell, J., and Zomerdijk, J.C. 2006. Casein kinase 2 associates with initiation-competent RNA polymerase I and has multiple roles in ribosomal DNA transcription. *Mol Cell Biol* **26**(16): 5957-5968.
- Percipalle, P., Fomproix, N., Cavellan, E., Voit, R., Reimer, G., Kruger, T., Thyberg, J., Scheer, U., Grummt, I., and Farrants, A.K. 2006. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO Rep* **7**(5): 525-530.
- Peterson, R.T., Desai, B.N., Hardwick, J.S., and Schreiber, S.L. 1999. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4438-4442.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., and Riva, M. 2000. The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J* **19**(20): 5473-5482.

- Philimonenko, V.V., Zhao, J., Iben, S., Dingova, H., Kysela, K., Kahle, M., Zentgraf, H., Hofmann, W.A., de Lanerolle, P., Hozak, P., and Grummt, I. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* **6**(12): 1165-1172.
- Pinna, L.A. 1990. Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* **1054**(3): 267-284.
- Pinna, L.A. 2003. The raison d'etre of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2. *Acc Chem Res* **36**(6): 378-384.
- Powers, T. and Walter, P. 1999. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**(4): 987-1000.
- Reeder, R.H. 1999. Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 293-327.
- Reeder, R.H. and Roeder, R.G. 1972. Ribosomal RNA synthesis in isolated nuclei. *J Mol Biol* **67**(3): 433-441.
- Rudloff, U., Eberhard, D., Tora, L., Stunnenberg, H., and Grummt, I. 1994. TBP-associated factors interact with DNA and govern species specificity of RNA polymerase I transcription. *Embo J* **13**(11): 2611-2616.
- Russell, J. and Zomerdijk, J.C. 2006. The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem Soc Symp*(73): 203-216.
- Saez-Vasquez, J., Meissner, M., and Pikaard, C.S. 2001. RNA polymerase I holoenzyme-promoter complexes include an associated CK2-like protein kinase. *Plant Mol Biol* **47**(3): 449-459.
- Saez-Vasquez, J. and Pikaard, C.S. 1997. Extensive purification of a putative RNA polymerase I holoenzyme from plants that accurately initiates rRNA gene transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(22): 11869-11874.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., ed. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, USA.
- Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S.P., Donella-Deana, A., Shugar, D., and Pinna, L.A. 2001. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* **496**(1): 44-48.
- Schlosser, A., Bodem, J., Bossemeyer, D., Grummt, I., and Lehmann, W.D. 2002. Identification of protein phosphorylation sites by combination of elastase digestion, immobilized metal affinity chromatography, and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2**(7): 911-918.

- Schnapp, A., Clos, J., Hadelt, W., Schreck, R., Cvekl, A., and Grummt, I. 1990. Isolation and functional characterization of TIF-IB, a factor that confers promoter specificity to mouse RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* **18**(6): 1385-1393.
- Schnapp, A. and Grummt, I. 1991. Transcription complex formation at the mouse rDNA promoter involves the stepwise association of four transcription factors and RNA polymerase I. *J Biol Chem* **266**(36): 24588-24595.
- Schnapp, A., Schnapp, G., Erny, B., and Grummt, I. 1993. Function of the growth-regulated transcription initiation factor TIF-IA in initiation complex formation at the murine ribosomal gene promoter. *Mol Cell Biol* **13**(11): 6723-6732.
- Schneider, D.A. and Nomura, M. 2004. RNA polymerase I remains intact without subunit exchange through multiple rounds of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(42): 15112-15117.
- Schwarzacher, H.G. and Wachtler, F. 1993. The nucleolus. *Anat Embryol (Berl)* **188**(6): 515-536.
- Seither, P. and Grummt, I. 1996. Molecular cloning of RPA2, the gene encoding the second largest subunit of mouse RNA polymerase I. *Genomics* **37**(1): 135-139.
- Seither, P., Iben, S., and Grummt, I. 1998. Mammalian RNA polymerase I exists as a holoenzyme with associated basal transcription factors. *J Mol Biol* **275**(1): 43-53.
- Seither, P., Iben, S., Thiry, M., and Grummt, I. 2001. PAF67, a novel protein that is associated with the initiation-competent form of RNA polymerase I. *Biol Chem* **382**(8): 1163-1170.
- Seither, P., Zatschina, O., Hoffmann, M., and Grummt, I. 1997. Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I. *Chromosoma* **106**(4): 216-225.
- Sekiguchi, T., Nohiro, Y., Nakamura, Y., Hisamoto, N., and Nishimoto, T. 1991. The human CCG1 gene, essential for progression of the G1 phase, encodes a 210-kilodalton nuclear DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* **11**(6): 3317-3325.
- Shamji, A.F., Nghiem, P., and Schreiber, S.L. 2003. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol Cell* **12**(2): 271-280.
- Skinner, J.A., Ohrlein, A., and Grummt, I. 1984. In vitro mutagenesis and transcriptional analysis of a mouse ribosomal promoter element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 2137-2141.
- Song, D.H., Dominguez, I., Mizuno, J., Kaut, M., Mohr, S.C., and Seldin, D.C. 2003. CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem* **278**(26): 24018-24025.
- Song, D.H., Sussman, D.J., and Seldin, D.C. 2000. Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **275**(31): 23790-23797.

- Thornburg, W. and Lindell, T.J. 1977. Purification of rat liver nuclear protein kinase NII. *J Biol Chem* **252**(19): 6660-6665.
- Tuan, J.C., Zhai, W., and Comai, L. 1999. Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2872-2879.
- Voit, R., Kuhn, A., Sander, E.E., and Grummt, I. 1995. Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res* **23**(14): 2593-2599.
- Voit, R., Schnapp, A., Kuhn, A., Rosenbauer, H., Hirschmann, P., Stunnenberg, H.G., and Grummt, I. 1992. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *Embo J* **11**(6): 2211-2218.
- Wandelt, C. and Grummt, I. 1983. Formation of stable preinitiation complexes is a prerequisite for ribosomal DNA transcription in vitro. *Nucleic Acids Res* **11**(11): 3795-3809.
- Whitehead, C.M., Winkfein, R.J., Fritzler, M.J., and Rattner, J.B. 1997. ASE-1: a novel protein of the fibrillar centres of the nucleolus and nucleolus organizer region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* **106**(8): 493-502.
- Wright, J.E., Mais, C., Prieto, J.L., and McStay, B. 2006. A role for upstream binding factor in organizing ribosomal gene chromatin. *Biochem Soc Symp*(73): 77-84.
- Yamamoto, K., Yamamoto, M., Hanada, K., Nogi, Y., Matsuyama, T., and Muramatsu, M. 2004. Multiple protein-protein interactions by RNA polymerase I-associated factor PAF49 and role of PAF49 in rRNA transcription. *Mol Cell Biol* **24**(14): 6338-6349.
- Yamamoto, O., Takakusa, N., Mishima, Y., Kominami, R., and Muramatsu, M. 1984. Determination of the promoter region of mouse ribosomal RNA gene by an in vitro transcription system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(2): 299-303.
- Yamamoto, R.T., Nogi, Y., Dodd, J.A., and Nomura, M. 1996. RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *Embo J* **15**(15): 3964-3973.
- Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U., and Grummt, I. 2002. Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-1A and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep* **3**(11): 1082-1087.
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, H.J., Schutz, G., and Grummt, I. 2005. Genetic inactivation of the transcription factor TIF-1A leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* **19**(1): 77-87.

- Zhao, J., Yuan, X., Frodin, M., and Grummt, I. 2003. ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell* **11**(2): 405-413.
- Zomerdijk, J.C., Beckmann, H., Comai, L., and Tjian, R. 1994. Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science* **266**(5193): 2015-2018.
- Zylber, E.A. and Penman, S. 1971. Products of RNA polymerases in HeLa cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(11): 2861-2865.

7 Publikationen

Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., Larsson, L.G., and Wright, A.P. 2005. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* **7**(3): 303-310.

Mayer, C., Bierhoff, H., and Grummt, I. 2005. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* **19**(8): 933-941.

Bierhoff, H., Dundr, M., and Grummt, I. CK2-dependent phosphorylation of TIF-IA affects the dynamics of RNA polymerase I and facilitates reinitiation of transcription.

in Vorbereitung