

## Zusammenfassung

Die Transkription eukaryotischer Gene zur Produktion reifer mRNA-Transkripte ist ein komplexer Prozess, an dem neben der chromosomalen DNA eine Vielzahl von Proteinfaktoren beteiligt ist. Kurz nach der Transkriptionsinitiation kommt es zu einem Arrest, der als Kontrollpunkt vor dem Eintritt in die produktive Elongation dient. Die Wiederaufnahme der Transkription wird erst durch die Wirkung eines positiven Transkriptionselongationsfaktors (P-TEFb) möglich, der zu einer spezifischen Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA Polymerase II führt. P-TEFb besteht aus der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk9 und einem Cyclin T. Die funktionale Bedeutung von P-TEFb für die eukaryotische Genexpression wurde zuerst an der HIV stimulierten Transkription erkannt. HIV-1 rekrutiert P-TEFb an die RNA Polymerase II über die Assoziation mit dem viralen Transaktivatorprotein Tat und der Promotor TAR RNA. Erst im Jahre 2003 wurde entdeckt, dass auch P-TEFb selbst reguliert wird und zusammen mit dem Protein Hexim1 und der kleinen nukleären RNA 7SK in einem inaktiven Komplex vorliegt. Das 43 kDa große Hexim1 Protein inhibiert die Kinaseaktivität von Cdk9 und ist so an der Regulation der CTD Phosphorylierung beteiligt. Neben der HIV-stimulierten Genexpression sind Fehlregulationen von P-TEFb in verschiedenen Tumorgeweben sowie in dem Krankheitsbild der Herzmuskelzell-Hypertrophie gefunden worden sind. Die hier vorgestellte Arbeit befasst sich mit der Erforschung der molekularen Mechanismen der Regulation der Transkriptionselongation mit biochemischen und biophysikalischen Methoden.

Zunächst konnte eine stabile, C-terminale Domäne von 12,5 kDa Größe in Hexim1 identifiziert werden, die notwendig für die Bindung an Cyclin T und die Inhibierung der Kinaseaktivität von P-TEFb ist. Mittels Größenausschlusschromatographie und isothermaler Titrationskalorimetrie konnte dabei gezeigt werden, dass diese als Cyclin T-bindende Domäne (TBD) bezeichnete Region einen Homodimer ausbildet. Titrationsexperimente mit fluoreszenzmarkiertem Hexim1 Protein im Gleich-gewichtsmodus und mittels schneller stopped flow Kinetik lieferten eine Dissoziations-konstante für die Bindung an Cyclin T1 von etwa 1,5  $\mu\text{M}$ . In einem fluoreszenzbasierten Kompetitions-Verdrängungsassay konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Cyclin T1 und Hexim1 maßgeblich durch elektrostatische Wechselwirkungen getrieben ist, die auf Seiten der TBD eine negativ geladene Oberfläche einschließt. In Cyclin T1 sind basische Reste am C-Terminus der Cyclinbox-Domäne, die als Tat/TAR Erkennungs-motiv (TRM) bekannt sind, in die Bindung involviert. Übereinstimmend hiermit konnte in Präzipitationsexperimenten und mittels analytischer Gelfiltration eine wechselseitig exklusive Bindung von Cyclin T1 an Hexim1 oder an das virale Transaktivatorprotein Tat beobachtet werden. Schließlich konnte in funktionalen Experimenten gezeigt werden, dass die TBD für die Bindung von Hexim1 an P-TEFb und die Inhibierung der Transkriptionsaktivität *in vivo* notwendig ist.

In weiteren Experimenten wurde der transkriptionsstimulierende Komplex aus Cyclin T1, Tat und TAR RNA untersucht. Dabei wurden zunächst Fusionskonstrukte bestehend aus der Cyclinbox-Domäne von humanem Cyclin T1 (1-281) und equine Tat (1-69) generiert und

verschiedene TAR Konstrukte unterschiedlicher Länge und unterschiedlicher Nukleotidzusammensetzung der Stamm-schleife unter Verwendung des T7 Promotorsystems transkribiert. In elektrophoretischen Mobilitäts-verschiebungssassays (EMSA) konnte die spezifische Protein-RNA Komplexbildung beobachtet werden, die als Grundlage für weiterführende Kristallisationstests diente. Als Zwischenergebnisse konnten in Zusammenarbeiten die Strukturen der Hexim1-TBD und der Cyclinboxdomäne von CycT1 bestimmt werden.

In einem zweiten Projekt konnte die Struktur der N-terminalen Domänen des humanen Formin Proteins FHOD1 mittels Röntgenkristallographie bestimmt werden. Formine nehmen eine bedeutende Rolle im Aufbau des Aktinzytoskeletts ein, indem sie die Filamentbildung unverzweigter Aktinstränge am stumpfen Ende induzieren. Dabei werden die Diaphanous-verwandten Formine, zu denen auch das 126 kDa große FHOD1 gehört, durch einen Autoregulationsmechanismus zwischen einem C-terminalen Signalmotiv und einer N-terminalen Erkennungsdomäne (FH3 Domäne) inhibiert, der erst durch die Wirkung einer aktivierten GTPase der Rho/Rac-Familie aufgehoben werden kann. Die N-terminale Domänenstruktur von FHOD1 konnte dabei weder aus Sequenz-homologien zu anderen Forminen noch aus Datenbankvergleichen bekannter Domänenfamilien abgeleitet werden.

Überraschenderweise zeigte die N-terminale Domäne (1-115) eine Ubiquitinfaltung, an die sich unmittelbar eine Armadillorepeatstruktur von fünf Repeats anschließt (116-339), gefolgt von einer flexiblen Linkersequenz (340-377). Aufgrund eines spezifischen, positiven Ladungsmusters kann die N-terminale Domäne als Ras-bindende Domäne (RBD) identifiziert werden, deren strukturelle Ähnlichkeit mit einem RMSD-Wert von 2,5 Å für die C<sub>α</sub> Atome am größten zur RBD der Phosphoinositol-3-Kinase ist. Insbesondere eine 16 Aminosäuren lange Schleife zwischen den ersten beiden β-Faltblattsträngen, die durch ein exponiertes Phenylalanin auf den ersten Repeat der Armadillostruktur zurückfaltet, trägt dabei zur Spezifität der FHOD1-RBD bei. Zwei positive Ladungsreste innerhalb dieser Schleife, R38 und R39, liegen in unmittelbarer Nähe des C-Terminus der ersten α-Helix, so dass vermutet werden kann, dass diese Reste an der Bindung zur GTPase beteiligt sind. Die nachfolgende Armadillodomäne setzt sich aus fünf Repeats zusammen, die trotz unterschiedlicher Sequenzlängen von 36 bis 55 Aminosäuren eine homogene, konkav geformte Oberfläche der inneren Helices ausbilden. Obwohl diese Faltung nicht aus der Sequenz heraus vorhergesagt werden konnte, scheint dieses Strukturelement, das hier zum zweiten Mal in einem Formin identifiziert wurde, in Diaphanous-verwandten Forminen konserviert zu sein. Die aus der Kristallstruktur in ihren Domänengrenzen definierte FH3 Domäne in FHOD1 zeigt aber im Vergleich zu dem Formin mDia Unterschiede in der Bindungsoberfläche zu der C-terminalen auto-regulatorischen Domäne. Zusammenfassend lassen sich aus der hier bestimmte Kristallstruktur der N-terminalen Domänen von FHOD1 Ähnlichkeiten in der modularen Architektur der strukturell konservierten FH3 Domäne ableiten, die auch auf andere Formine übertragen werden können. Die GTPase-bindende Domäne scheint dagegen charakteristisch für FHOD Formine zu sein und wird nun als RBD hinsichtlich ihrer Aktivierung durch die Assoziation mit einer spezifischen GTPase untersucht werden.