

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Regulation des Transkriptionsfaktors P-TEFb

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie an der Technischen Universität Dortmund

Angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund

vorgelegt von

Dipl.-Biologin Friederike Vollmuth

Aus Mülheim an der Ruhr

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2006 bis Juni 2010 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung für Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von PD Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Organisation des Erbgutes	3
2.2	Die Transkription in eukaryotischen Zellen	4
2.2.1	Die RNA Polymerase II als Enzym des Transkriptionszyklus	5
2.2.2	Transkriptionsinitiation und allgemeine Transkriptionsfaktoren	6
2.2.3	Elongation und Termination der Transkription	7
2.3	Die Regulation der Transkriptionselongation durch die CTD von Pol II Rpb1	8
2.4	Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb)	9
2.4.1	Der transaktivierte P-TEFb-Komplex in HIV-1-infizierten Zellen	11
2.5	Die Regulation von P-TEFb durch den 7SK snRNP-Komplex	12
2.5.1	Hexim1/2 und die 7SK snRNA	12
2.5.2	Larp7 als Stabilisator der 7SK snRNA	13
2.5.3	Das La Protein als Beispiel eines Larp7-verwandten Proteins	15
2.5.4	Die Überführung von P-TEFb in den aktiven Zustand durch Brd4	16
2.6	Posttranslationale Modifikationen in Histonen	16
2.6.1	Die Acetylierung von Histonen	17
2.6.2	Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs)	17
2.6.3	Bromodomänen als Acetyllysin-Bindungsdomänen	18
2.6.4	Methylierung und Citrullierung von Histonen	20
2.6.5	Propionylierung und Butyrylierung als neue Modifikation in Histonen	20
2.8	Das Bromodomänen-enhaltenden Protein 4 (Brd4)	21
2.8.1	Die Assoziation von Brd4 mit mitotischen Chromosomen	22
2.8.2	Funktionen von Brd4 in viralen Systemen	22
2.8.3	Brd4 als Aktivator des P-TEFb-Komplexes	23
2.8.4	Zielsetzung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Chemikalien	25
3.1.1	Feinchemikalien	25
3.1.2	Nukleotide	25
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.4	Molekularbiologische Kits	25
3.1.5	Chromatographiematerialien	25
3.1.6	Größenstandards	26
3.2	Mikroorganismen und Zellstämme	26
3.3	Enzyme	26
3.4	Synthetische Peptide	26
3.5	Nukleinsäuren	27
3.6	Geräte	27
3.7	Molekularbiologische Methoden	28
3.7.1	Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. <i>polymerase chain reaction</i>)	28
3.7.2	Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	28
3.7.3	Restriktionsverdau	29
3.7.4	Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor	29
3.7.5	Transformation und Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	30
3.7.6	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> -Zellen	30
3.7.7	Sequenzierung eines DNA-Fragmentes	31
3.7.8	Herstellung einer <i>E. coli</i> -Glycerinkultur	31

3.7.9	Proteinüberexpression in <i>E. coli</i> -Zellen	31
3.7.10	Expression von Proteinen in Insektenzellen	31
3.7.11	<i>In-vitro</i> Synthese von RNAs	32
3.8	Biochemische Methoden	32
3.8.1	Aufschluss einer Expressionskultur	32
3.8.2	Affinitätschromatographie	32
3.8.3	Konzentrierung von Proteinlösungen	33
3.8.4	Entfernung des Affinitätsankers durch proteolytischen Verdau	34
3.8.5	Größenausschlusschromatographie / Gelfiltration	34
3.8.6	Ionenaustauschchromatographie	35
3.8.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	35
3.8.8	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.8.9	Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	37
3.8.10	LiCl-Isopropanolfällung von RNAs	37
3.8.11	GST-Immobilisationsexperiment	37
3.8.12	Elektrophoretischer Gelverschiebungstest (EMSA)	38
3.8.13	Kinaseassay	39
3.9	Biophysikalische Methoden	40
3.9.1	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS)	40
3.9.2	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	41
3.9.3	CD-Spektroskopie	42
3.9.4	Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	42
4	Ergebnisse	47
4.1	Funktionelle Untersuchungen der Aktivierung von P-TEFb durch Brd4	47
4.1.1	Bestimmung der aktivierenden Domäne von Brd4 auf P-TEFb	48
4.1.2	Vergleich des HIV-1 Tat-Proteins und der CT-Domäne von Brd4	52
4.1.3	Zeitaufgelöste Analyse der Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 CT	57
4.1.4	Analyse der Interaktion von Brd4 CT mit P-TEFb	60
4.2	Erkennung von Histonmotiven durch die Bromodomänen von Brd4	64
4.2.1	Darstellung und Kristallisation der Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4	64
4.2.2	Kristallstrukturen der Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4	65
4.2.3	Interaktion von BD1 und BD2 mit acetylierten Histonfragmenten	70
4.2.4	Analyse der Bindung von anderen Modifikationen an Bromodomänen	79
4.2.5	Bindung von acetylierten CycT1-Peptiden an BD2	81
4.2.6	Bindung von erweiterten Acyllysineptiden an Bromodomänen	82
4.2.7	Vergleichende Analyse der Bindung eines doppelt-acetylierten Peptids	91
4.3	Biochemische Charakterisierung des Ribonukleoproteins Larp7	95
4.3.1	Darstellung der verschiedenen Larp7-Konstrukte	95
4.3.2	Biochemische Charakterisierung der Larp7-Konstrukte	97
4.3.3	Bindung von Larp7 und der 7SK RNA	99
5	Diskussion	106
5.1	Regulation des P-TEFb-Komplexes durch Brd4 CT	106
5.2	Interaktionen der Bromodomänen von Brd4 mit modifizierten Histonsequenzen	111
5.3	Larp7 als stabilisierender Faktor des 7SK snRNP	121
6	Anhang	125
7	Literaturverzeichnis	128

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
ADPNHP	Adenylylimidodiphosphat
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	Argininreiches Motif
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BD	Bromodomäne
BET-Familie	Protein-Familie mit Bromodomänen und einer ET-Domäne
Bp	Basenpaar
Brd4	Bromodomänen-enthaltendes Protein 4
CD	Zirkulardichroismus
Cdk9	Cyclin-abhängige Kinase 9 (engl. <i>cyclin-dependent kinase 9</i>)
cpm	Ausschläge pro Minute (engl. <i>counts per minutes</i>)
CT	C-Terminale Domäne von Brd4
CTD	C-Terminale Domäne von RNA Pol II Rpb1
CT-W	C-Terminale Domäne von Brd4 mit zusätzlichem Tryptophan
C-Terminus	Carboxyterminus
CycT1	Cyclin T1
ΔG	Änderung der Gibb'schen freien Energie
ΔH	Änderung der Enthalpie
ΔS	Änderung der Entropie
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Ethylenglykol
EMSA	Elektrophoretischer Gelverschiebungstest (engl. <i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
EtBr	Ethidiumbromid
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
H3/H4	Histon 3 bzw. 4
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	N- (2- Hydroxyethyl) Piperazine -2- ethanesulfonic Acid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Hexim1	HMBA-induzierbares Protein 1
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie (engl. <i>isothermal titration calorimetry</i>)
K(ac)	acetyliertes Lysin
K(but)	butyryliertes Lysin
K(prop)	propionyliertes Lysin

Abkürzungsverzeichnis

K(val)	valeroyliertes Lysin
K _d	Dissoziationskonstante
Larp7	La-verwandtes Protein 7 (engl. <i>La-related protein 7</i>)
MePCE	Methylphosphat-Cappingenzym
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
n	Stöchiometrie einer Bindung
NELF	negativer Elongationsfaktor
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-triessigsäure (engl. <i>nickel nitrilo tri acetic acid</i>)
nt	Nukleotid(e)
N-Terminus	Aminoterminus
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank
PIC	Präinitiationskomplex (engl. <i>preinitiation complex</i>)
PEG	Polyethylenglykol
Pol II	RNA-Polymerase II
P-TEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
pSer2	Phosphoserin an Position 2 der CTD
rms	Wurzel des quadratischen Mittelwerts(engl. <i>root mean square</i>)
rmsd	Wurzel des mittleren Abstandsquadrats (engl. <i>root mean square deviation</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolution per minute</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure (engl. <i>small nuklear ribonucleic acid</i>)
TAR	Transaktivationsresponselement
Tat	Transaktivator der Transkription
TBD	Cyclin T1 Bindungsdomäne
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOF	Flugzeit (engl. <i>Time of flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt. Aminosäuren wurden als Einbuchstabencode gemäß den Empfehlungen von IUPAC und IUB verwendet (IUPAC-IUB, 1968).

1 Zusammenfassung

In eukaryotischen Zellen wird die RNA Pol II-vermittelte Transkription durch eine Arrestphase reguliert, die die Transkriptionsmaschinerie von der Initiation- in die Elongationsphase überführt. Dieser Arrest ist ein wichtiger Kontrollpunkt der Transkription, da durch Bindung negativer Transkriptionsfaktoren an die Transkriptionsmaschinerie die korrekte Prozessierung entstehender mRNA gewährleistet wird. Der Arrest kann erst durch den positiven Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb, bestehend aus der Kinase Cdk9 und deren Cyclin-Untereinheit CycT1, aufgehoben werden. Einerseits phosphoryliert dieser regulatorische Proteinkomplex die negativen Transkriptionsfaktoren und hebt deren arrestierende Wirkung auf. Andererseits hyperphosphoryliert er die C-terminale Domäne (CTD) der RNA Pol II-Untereinheit Rpb1 spezifisch an der Serin 2 (Ser2)-Position der 52 repetitiven Heptad-sequenzen. Die Ser2-Phosphorylierung der CTD führt zu einer Fortsetzung der Transkriptionselongation. Aufgrund seiner zentralen Funktion in der Transkriptionselongation unterliegt P-TEFb selbst einer strengen Kontrolle. Das Protein Hexim1 unterdrückt mit Hilfe der stabilisierenden snRNA 7SK die Kinaseaktivität von Cdk9 und führt zur Bildung eines inhibierten Komplexes. Die 7SK snRNA wird ihrerseits durch 3'-terminale Bindung des Proteins Larp7 stabilisiert und vor Abbau geschützt. Die Aktivierung von P-TEFb aus dem inhibierten Komplex heraus wird durch die Komplexierung mit dem Protein Brd4 erreicht, welches auf bislang unbekanntem Weg die inhibierenden Faktoren Hexim1/7SK/Larp7 von P-TEFb entfernt und damit die Kinaseaktivität von Cdk9 wiederherstellt. Darüber hinaus stellt Brd4 einen möglichen Faktor zur Rekrutierung von P-TEFb an den Ort der Transkription dar, da es über seine zwei Bromodomänen mit acetylierten Chromatinstrukturen interagieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 untersucht. Dabei konnte in einem funktionalen Kinaseassay gezeigt werden, dass allein die C-terminale Domäne (CT) von Brd4 die Aktivierung von P-TEFb aus dem inhibierten Zustand vermittelt, während die N-terminal gelegenen Bromodomänen BD1 und BD2 keine regulatorische Wirkung hatten. CT scheint dabei sowohl die inhibierende Wirkung von Hexim1 aufzuheben, als auch die Aktivität von P-TEFb direkt zu stimulieren. Durch Mutationsstudien an vier auffallenden Aminosäuresequenzmotiven von Brd4 CT wurde deutlich, dass vor allem ein positiv-geladener Sequenzabschnitt (1367-1375) und ein C-terminales Dileucinmotiv (L1391/L1392) für die Aktivierung von P-TEFb aus dem Hexim1-gebundenen Zustand eine bedeutende Rolle spielen. Trotz funktioneller und sequenzieller Ähnlichkeiten von CT zu dem viralen HIV-1 Tat-Protein scheint hier jedoch ein anderer Aktivierungsmechanismus vorzuliegen. Im Unterschied zu Tat interagiert CT nicht mit den Cyclinboxen von CycT1. Interessanterweise konnte jedoch eine direkte Interaktion zwischen Brd4 CT und P-TEFb nachgewiesen werden, deren Dissoziationskonstante von 1,2 μM eine mittelstarke Bindung anzeigt. Eine Verdrängung von Hexim1 von CycT1, wie sie für HIV-1 Tat beobachtet wurde, liegt im Falle von CT nicht vor, weswegen die Bindung von CT an P-TEFb vermutlich über die Cdk9-Untereinheit vermittelt wird. Kinetische Studien der Phosphorylierung eines GST-CTD-Substrats machten zudem deutlich, dass in Gegenwart

von Brd4 CT die Phosphatgruppenübertragung signifikant beschleunigt wird, jedoch keine Verschiebung der Substratspezifität beobachtet werden kann.

Die Bestimmung der hochaufgelösten Kristallstrukturen der Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4 in der vorliegenden Arbeit lieferten detaillierte Einblicke in die Mechanismen der Erkennung acetylierter Histonsequenzen. Mittels synthetischer Oktapeptide von H3 und H4 Histonsequenzen, die acetylierte Lysine enthielten, wurde die Interaktion zwischen den Bromodomänen (BDs) und den Acetyllysinpeptiden strukturell charakterisiert und durch Ermittlung der Dissoziationskonstanten im Bereich von 100-300 μM quantifiziert. Die Struktur eines Komplexes aus BD1 und einem acetylierten Histonpeptid H3-K14(ac) zeigte, dass das Acetyllysin in der Bindungstasche durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff des Acetyllysin und N140 von BD1 stabilisiert wird. Die Methylgruppe des Acetyllysin wird von hydrophoben Kontakten zu konservierten Resten der Bindungstasche positioniert und verdeutlicht den notwendigen dualen Charakter eines Restes mit polaren und hydrophoben Eigenschaften, der die Bindung an BDs ermöglicht. In der Struktur von BD2 war die Bindungstasche aufgrund der Kristallpackung durch den N-Terminus des Nachbarmoleküls belegt und wurde nicht zur Komplexbildung eingesetzt.

Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass Bromodomänen auch andere Acetyllysinmodifikationen wie Propionyl- und Butyryllysin binden können. Propionylierte Histonfragmente zeigten ähnliche Dissoziationskonstanten zu BD1 und BD2 wie acetylierte Peptide, während eine Interaktion des weiter verlängerten Butyryllysin im Oktapeptidkontext nicht nachweisbar war. Trotzdem konnten Kristallstrukturen von BD1 im Komplex sowohl mit Propionyllysin- als auch mit Butyryllysinpeptiden gelöst werden, in denen beide Modifikationen identische Positionen in der Bindungstasche von BD1 im Vergleich zu Acetyllysin einnehmen. Dies hat im Falle von Butyryllysin eine Neigung des Restes zur Folge, welche die polaren und hydrophoben Kontakte negativ beeinträchtigen. Die Modifikationen stellen die ersten beschriebenen Nicht-Acetyllysinreste dar, die im Histonkontext in Bromodomänen binden und damit das Erkennungsmuster von BDs erweitern. Es wurde in der vorliegenden Arbeit zudem eine Interaktion von Brd4 BD2 mit zwei acetylierten Fragmenten von CycT1 beobachtet, die möglicherweise bei der Lösung von Brd4 von Chromatinstrukturen eine Rolle spielt. Eine bevorzugte Bindung eines doppelt-acetylierten Histonmotives H4-K5(ac)K8(ac) an BD1 über BD2 mit einer Dissoziationskonstante von 38 μM wurde auch für Brd4 bestätigt und ergänzt das bestehende Bild der Erkennung von distinkten Histonmarkierungen durch BDs.

Zur biochemischen Charakterisierung des 7SK-bindenden Proteins Larp7 als Bestandteil des inhibierten P-TEFb-Komplexes wurden drei Konstrukte von Larp7 durch optimierte Reinigungen von unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren isoliert. Dadurch wurde eine erstmalige Charakterisierung der Sekundärstrukturelemente des Proteins und eine Analyse der Interaktion mit der 7SK snRNA ermöglicht. Durch den Einsatz von Heparin konnte eine unspezifische Interaktion zwischen 7SK und Larp7 unterbunden werden. Dadurch wurde eine vorrangige Rolle der N-terminalen La- und RRM1-Domänen von Larp7 bei der Bindung an 7SK erkannt. Ein 3' 39 nt-Fragment der 7SK snRNA, welches mit Larp7 interagiert, könnte einen ersten Ansatz zur strukturellen Analyse des Larp7:7SK-Komplexes darstellen.

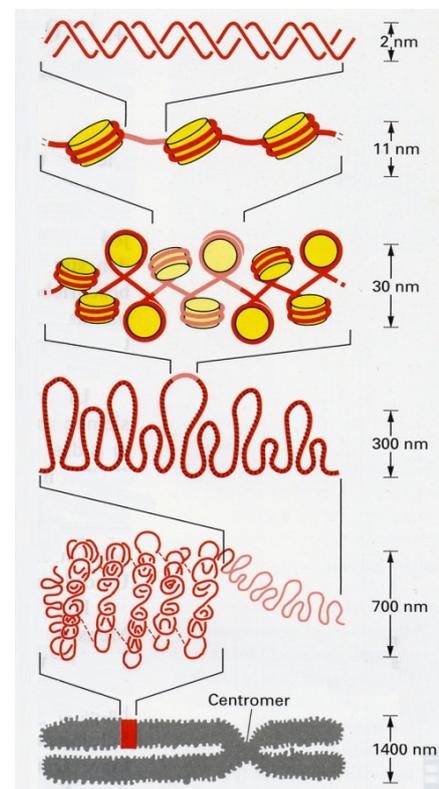
2 Einleitung

In eukaryotischen Zellen ist die Erbinformation eines Organismus in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) im Zellkern gespeichert (Avery et al., 1944). Die DNA bildet eine Doppelhelix aus zwei um sich gewundenen, gegenläufigen Nukleotidsträngen aus. Dabei sind die einzelnen Ribosemoleküle kovalent über je eine Phosphatgruppe verbunden und formen das äußere Gerüst der Helix, während die inneren, stickstoffhaltigen Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin durch ihre Abfolge die spezifische Information des Erbgutes tragen (Watson und Crick, 1953). Durch die Aufdeckung der komplementären Basenpaarung im Inneren des Zucker-Phosphat-Rückgrats durch Watson und Crick wurde gleichzeitig der Mechanismus der Replikation der DNA deutlich, bei dem, ausgehend von einem einzelsträngigen Matrizenstrang, sich der komplementäre Strang aus der Reihenfolge der Basen ergibt und von der DNA-Polymerase δ/ϵ unter Verwendung freier Nukleotide passend zum Ausgangsstrang synthetisiert werden kann. Durch die Transkription und Translation kann die gespeicherte Erbinformation umgesetzt und in Form von RNA (Ribonukleinsäure, engl. *ribonucleic acid*) oder Proteinen genutzt werden (siehe Abschnitt 2.2).

2.1 Die Organisation des Erbgutes

Das menschliche Genom besteht aus etwa $3 \cdot 10^9$ Basenpaaren (bp, engl. *base pairs*), organisiert in 23 doppelt vorkommenden Chromosomen. Da die Gesamtlänge der DNA (etwa 2 Meter pro Zelle) den Durchmesser des Zellkerns ($6 \mu\text{m}$) bei weitem überschreitet, wird sie während der Mitose kondensiert. Dabei wird die DNA in zwei Umdrehungen um ein Proteinoktamer gewunden, welches aus Histonen aufgebaut ist und mit der DNA das Nukleosom bildet (Abbildung 1; Kornberg, 1974). Histone sind mit 100-150 Aminosäuren relativ kleine Proteine, die sich durch einen hohen Anteil basischer Aminosäuren auszeichnen und hochkonserviert sind. Der zentrale Bereich der Histone ist in drei α -Helices mit zwei kurzen, verbindenden Schleifen in der sogenannte Histonfaltung organisiert, während N-terminal längere Sequenzen ungefaltet vorliegen.

Abbildung 1: Organisation der DNA in Nukleosomen. Die doppelsträngige DNA wird durch die Windung um Histone in Nukleosomen organisiert. Diese werden durch Verdrehung gegeneinander zu Chromatin kondensiert, welches weiter verdichtet in seiner mitotischen Form als Chromosom vorliegt (nach: Alberts, 2003; .4. Auflage),



Die Histone 2A und 2B (H2A bzw. H2B) bilden zwei Dimere aus, die ihrerseits mit einem Tetramer aus je zwei Histonen H3 und H4 interagieren (Luger et al., 1997). Das gebildete Oktamer organisiert sich als eine Art Scheibe, um die 146 bp der DNA in zwei Windungen binden. Dabei bilden sich bevorzugt Interaktionen mit der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix durch positive Reste wie Lysine und Argininen der Histone. Zudem bilden sich Kontakte zu den Phosphaten der DNA durch Wasserstoffbrücken zu Amidgruppen der Hauptketten der Proteine (Luger et al., 1997). Neben den vier Histonproteinen, die den Nukleosomenkern bilden, existiert auch noch ein weiteres Histon H1, welches die DNA an den Ausgangsstellen des Nukleosomen bindet und fixiert. Hierdurch wird sowohl eine Stabilisierung des Komplexes erreicht, als auch die Beweglichkeit des Histonkörpers auf dem DNA-Strang sowie die Zugänglichkeit von Remodelling-Komplexen eingeschränkt (Brown, 2003). Aufgrund der histonfreien DNA-Bereiche zwischen den einzelnen Nukleosomen wird diese Organisationsform der DNA auch als Perlschnurform bezeichnet. Durch Verdrehung der DNA/Histon-Komplexe gegeneinander wird eine weitere Kondensierung erreicht, bei der die Histone unterschiedlicher Nukleosomen miteinander interagieren und das Chromatin bilden (Abbildung 1).

Weitere Kondensierungen des Chromatins ermöglichen eine endgültige Packung der DNA in die Chromosomen, wodurch eine annähernd 10.000fache Verdichtung der DNA erreicht wird (Alberts, 2003). Während der Interphase kann die stark kondensierte Chromatinstruktur der DNA durch DNA-Remodelling-Komplexe unter ATP-Verbrauch gelockert und zugänglich gemacht werden und auf der DNA kodierte Gene exprimiert werden (Näär et al., 2001). Bei erneutem Eintritt der Zelle in die Mitose erfolgt wieder eine Kondensierung der DNA.

2.2 Die Transkription in eukaryotischen Zellen

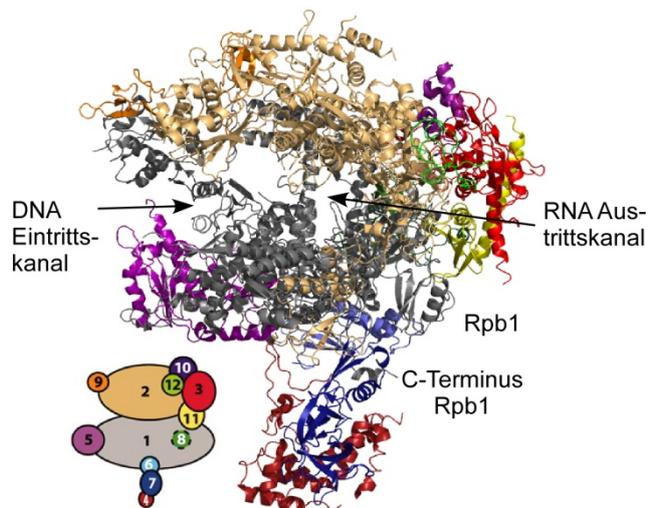
Zur Nutzbarmachung der in der DNA gespeicherten Information für die Synthese von Proteinen oder regulatorischen RNAs muss die DNA in eine für die Zelle verwendbare Form umgeschrieben (transkribiert) werden. Hierfür wird eine Kopie der DNA in Form der RNA angefertigt, welche in ihrer Basenfolge komplementär zur DNA, jedoch chemisch von ihr unterscheidbar ist. Diese Transkription der DNA in RNA ist einer der wichtigsten Prozesse in der menschlichen Zelle und wird von Hunderten von Proteinen und anderen Faktoren reguliert (Saunders et al., 2006). Sie ermöglicht eine schnelle und gezielte Reaktion auf äußere Einflüsse und/oder Bedürfnisse der Zelle und ist einer der wichtigsten Kontrollpunkte der Protein- und RNA-Produktion, welche die Funktionalität eines Organismus gewährleisten. Die Synthese der RNA-Stränge erfolgt durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol). Während in Prokaryoten und Archaeen nur eine Polymerase für die Synthese von RNA verantwortlich ist, werden in eukaryotischen Zellen drei verschiedene RNA-Polymerasen (Pol I-III) mit unterschiedlichen RNA-Produkten beschrieben: Pol I synthetisiert einen Großteil der ribosomalen RNA (rRNA), welche Bestandteil des Translationsapparates, des Ribosoms, ist. Pol II synthetisiert mRNA (Boten-RNA, engl.: *messenger RNA*), welche die Matrize zur Synthese von Proteinen darstellt, sowie einen Großteil der kleinen nukleären

RNAs (snRNA; engl: *small nuclear RNA*). Pol III schließlich synthetisiert tRNA (Transfer-RNA), welche als Trägermolekül für die in der Translation verwendeten Aminosäuren dient, sowie weiterer kleiner RNAs (siehe 7SK snRNA, 2.5.1). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Regulation der Pol II-abhängigen Transkription (2.2.1).

2.2.1 Die RNA Polymerase II als Enzym des Transkriptionszyklus

RNA Pol II ist ein Multiproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa 0,5 MDa, der aus 12 Untereinheiten besteht und für die Transkription aller proteincodierender Gene zuständig ist (Fuda et al., 2009). Ihr zentraler Kernkomplex ist hochkonserviert und beinhaltet das katalytische Zentrum, in welches über einen Kanal die zu transkribierende, einzelsträngige DNA bindet (Abbildung 2, DNA Eintrittskanal). Im katalytischen Zentrum erfolgt die Mg^{2+} -abhängige Synthese von mRNA mit einer Geschwindigkeit von 1000 bis 2000 Nukleotiden/min. Dabei wird zunächst die DNA fixiert und das komplementäre dNTP im aktiven Zentrum gebunden. Die Pyrophosphatgruppe des dNTPs wird durch das 3'-OH-Ende der RNA über eine Phosphodiesterbindung ersetzt und anschließend freigesetzt. Nun kann sich die Pol II auf der DNA weiterbewegen, und der Einbau des nächsten NTPs erfolgt. Matrize und synthetisierter Strang werden im Enzym getrennt und verlassen Pol II durch zwei separate Kanäle (Cramer et al., 2001; Gnatt et al., 2001; Armache et al., 2003; Kettenberger et al., 2004).

Abbildung 2 Struktur von RNA Pol II. Die Kristallstruktur von Pol II aus *S. cerevisiae* sowie ein Schema der einzelnen Proteine Rpb 1-12 zeigen einen globulären Proteinkomplex, dessen DNA Eintrittskanal von den größten Untereinheiten Rpb1 (grau) und Rpb2 (ocker) geformt wird. Der RNA Austrittskanal befindet sich am Ende dieses Kanals, senkrecht zur Betrachtungsebene. Der C-Terminus von Rpb1 ist in der Struktur nicht enthalten. Er würde sich nahe des RNA Austrittskanals befinden (Nach Armache et al., 2005; sowie PBD-Code 2VUM).



Eine wichtige Plattform zur Regulation der Transkription und der anschließenden mRNA-Prozessierung stellt die C-terminale Domäne (CTD) der Rpb1-Untereinheit von Pol II dar, welche sich nahe des RNA-Austrittskanals befindet. Dieser Serin-reiche Bereich besteht aus Wiederholungen der Sequenz YSPTSPS und kann in verschiedenen Phosphorylierungszuständen als variable und vielseitige Bindeplattform für unterschiedlichste Regulationsfaktoren fungieren (Meinhart et al., 2005; Chapman et al., 2008). Seine Bedeutung für die Kontrolle der mRNA-Synthese soll weiter unten näher beleuchtet werden (siehe 2.3).

Die RNA Pol II katalysierte Synthese einer mRNA verläuft in einem sich wiederholenden Zyklus. Dieser Transkriptionszyklus beginnt mit der Initiation, in welchem sich Pol II am Promotor anlagert, dem Start der Synthese und Verlassen des Promotors (engl.: *promotor clearance*). In der folgenden Elongation wird das begonnene mRNA-Transkript zu seiner vollen Länge synthetisiert, und mit der Termination endet der Synthese-

zyklus (Sims et al., 2004). Mit der Elongation und Termination geht eine Prozessierung und Reifung der mRNA einher, welche eine zusätzliche Qualitätskontrolle und Regulationsmöglichkeit garantiert. Nach der Termination eines mRNA-Strangs kann die Pol II in einen neuen Transkriptionszyklus eintreten.

Obwohl Pol II als Enzym für die Transkriptionselongation bei vorhandener DNA-Matrize und dNTPs *in vitro* ausreichend ist, benötigt sie für die Initiation der RNA-Synthese in der Zelle eine Reihe von zusätzlichen Proteinen, die erst eine korrekte Funktionsweise gewährleisten. Diese allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs, engl. *general transcription factors*) spielen vor allem bei der Rekrutierung der Pol II zum Promotor auf der DNA eine wichtige Rolle und bilden zusammen mit der RNA Polymerase II den Präinitiationskomplex (PIC, engl. *preinitiation complex*).

2.2.2 Transkriptionsinitiation und allgemeine Transkriptionsfaktoren

Die Bindung der Pol II an den Promotor wird hauptsächlich vom GTF TFIID (Transkriptionsfaktor für Pol II D) vermittelt. Der TFIID-Komplex interagiert mit der TATA-Box, einem DNA-Motiv etwa 25 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart, sowie dem Initiatorelement Inr, welches den Transkriptionsstartpunkt markiert (Smale und Kadonaga, 2003). Unterstützt wird die Interaktion von TFIID mit der DNA durch TFIIA und TFIIB, welche eine Bindungsplattform für TFIID bilden und gleichzeitig die Bindung der DNA verstärken. TFIIB vermittelt zudem die Interaktion von TFIID mit Pol II über eine Blockierung des RNA-Ausgangskanal der Pol II und muss als regulatorischer Faktor bei fortschreitender Elongation dissoziieren (Bushnell et al., 2004). Neben der proximalen TATA-Box kann auch eine entfernt liegende distale Enhancer-Sequenz bei der Rekrutierung des PIC's an die zu transkribierende DNA eine wichtige Rolle spielen. Sie kann durch Enhancer-Proteine wie Sp1 erkannt werden, die ihrerseits durch die Interaktion mit Aktivatoren die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie zur Transkriptionsstelle an der TATA-Box auf der DNA vermitteln. Der wichtigste dieser Aktivatoren ist der Mediator-Komplex, welcher u.a. die Rekrutierung der Pol II zum Promotor reguliert. Dabei bindet er an die Polymerase durch Erkennung der unphosphorylierten Form der Pol II CTD (Svejstrup et al., 1997; Asturias et al., 1999, siehe auch 2.3).

Neben dem Mediator spielt auch der GTF TFIIF eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Pol II zum Promotor, zudem beginnt er mit der Öffnung der beiden komplementären DNA-Stränge voneinander, um den Matrizenstrang freizulegen. Die fortschreitende Öffnung der DNA wird durch die ATPase-Aktivität von TFIIH erweitert, welcher, unterstützt durch TFIIE, als letztes an den PIC bindet (Wang et al., 1992). Die TFIIH-Untereinheit Cdk7/CycH phosphoryliert die CTD von Rpb1 an Serin 5 (Ser5) (siehe 2.3) und gibt damit das Signal zur Transkriptionsinitiation. Die initiale Ser5-Phosphorylierung kann zusätzlich durch den Mediator-Komplex stimuliert werden (Kim et al., 1997). TFIIH trägt außerdem eine Helikase-Untereinheit, welche die entstandene Transkriptionsblase weiter entwindet und getrennt hält. Nun kann die Polymerase den einzelsträngigen Matrizenstrang binden und die Transkription beginnen (Abbildung 3).

Die Pol II löst sich vom Promotor und einigen GTFs (*promotor clearance*) und beginnt mit der Synthese kurzer RNA-Fragmente, deren Synthese jedoch vorzeitig abgebrochen

wird. Es bildet sich ein früher Elongationskomplex (EEC, engl.: *early elongation complex*), welcher jedoch nicht mit der eigentlichen, produktiven Elongation fortfahren kann und vorübergehend arretiert wird. Erst auf weitere Stimuli hin kann er mit in der Elongation fortschreiten. Als Inhibitoren, die diesen Arrest auslösen, wirken hier unter anderem die Proteinkomplexe DSIF (engl.: *DRB-sensitivity factor*) und NELF (engl.: *negative elongation factor*), welche Pol II in dieser arretierten Elongation halten (Abbildung 3). Da während dieser Phase Capping-Enzyme an die Ser5-phosphorylierte CTD binden, die durch Übertragung einer 5' 7-methyl-GpppN-Kappe auf die RNA deren 5'-Ende vor Nukleasen schützen, könnte die entstandene Transkriptionspause eine vollständige Cappingreaktion am neuen Transkript gewährleisten (Pei et al., 2003).

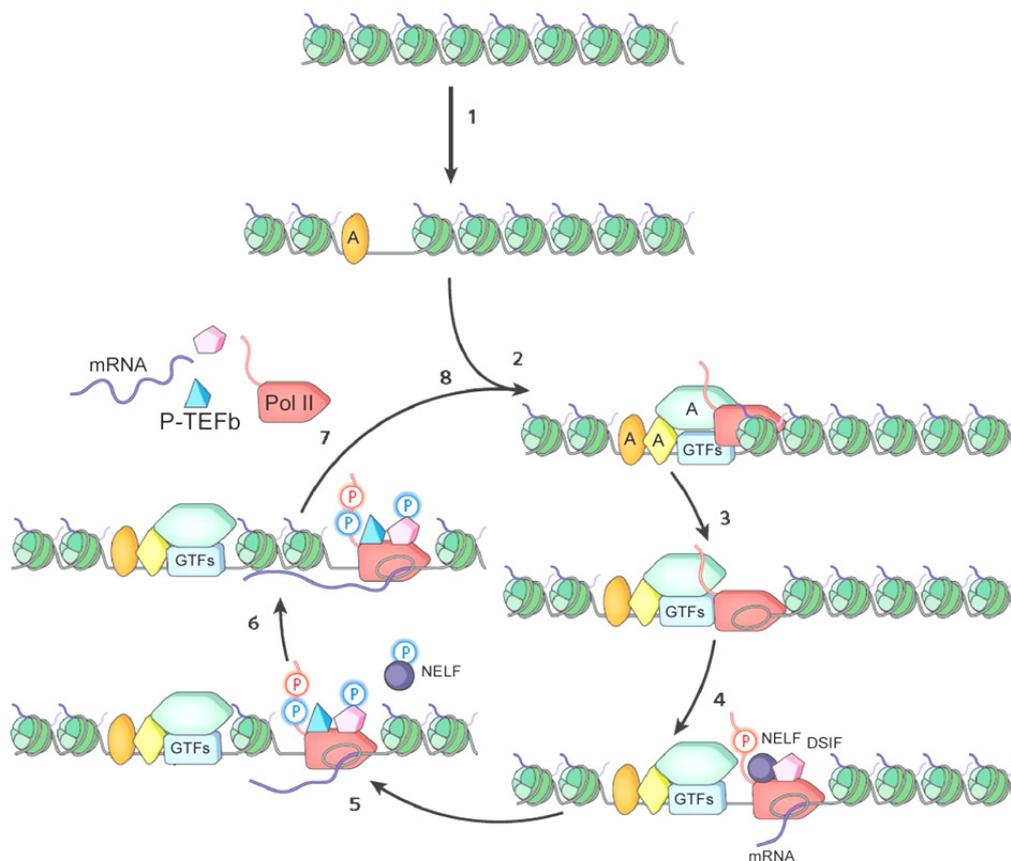


Abbildung 3: Transkriptionszyklus eines proteincodierenden Gens. Die Chromatinstruktur wird durch Bindung von Aktivatorproteinen (A) gelöst (1), und die Transkriptionsmaschinerie aus Pol II, GTFs und anderen Aktivatoren kann sich anlagern (2). Die DNA wird zur Transkriptionsblase geöffnet (3), Pol II löst sich vom Promotor und beginnt mit der Synthese der mRNA. Diese wird jedoch durch die Wirkung von NELF und DSIF blockiert und in einem Arrest gehalten (4). Erst durch die Phosphorylierung von NELF und DSIF durch P-TEFb wird deren arretierende Funktion aufgehoben, zusätzlich wird Ser2 der CTD phosphoryliert. NELF dissoziiert (5), und die Transkriptionselongation kann fortgeführt werden (6). Nach der Termination der Transkription werden Pol II, P-TEFb und DSIF freigesetzt und stehen für einen neuen Transkriptionszyklus zur Verfügung (nach: Fuda et al., 2009).

2.2.3 Elongation und Termination der Transkription

Zur Überbrückung des eukaryotischen Elongationsarrestes benötigt die Zelle den positiven Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb, engl.: *positive transcription elongation factor b*), der die Polymerase in die produktive Elongation überführt: Einerseits phosphoryliert P-TEFb Ser2 der CTD und remoduliert damit die Bindeplattform für die Bindung von Splicing- und

Polyadenylierungsfaktoren (McCracken et al., 1997b; Kim et al., 1997; Kim et al., 2004). Andererseits phosphoryliert P-TEFb sowohl DSIF als auch NELF, woraufhin NELF vom Elongationskomplex dissoziiert (Fujinaga et al., 2004; Yamada et al., 2006). DSIF bleibt gebunden und wird durch die Phosphorylierung in einen positiven Elongationsfaktor umgewandelt (Hartzog et al., 1998). Unterstützt von weiteren Elongationsfaktoren wie ELL und Elongin, kann nun die mRNA vollständig synthetisiert werden (Shilatifard et al., 2003; Saunders et al., 2006; siehe auch Abbildung 4). Das fertige Transkript wird aus der Polymerase entlassen und durch Polyadenylierung auch am 3'-Ende vor Abbau geschützt, sowie durch Splicingfaktoren, die Exons der mRNA entfernen, maturiert. Die mRNA wird zur Translation aus dem Zellkern exportiert und assoziiert mit der Translationsmaschinerie, dem Ribosom, welches unter Verwendung von Aminosäuren-beladener tRNAs die Basenfolge der mRNA in eine Aminosäurekette umsetzt und das codierte Protein synthetisiert. RNA Pol II kann nach der Termination der Transkription für einen weiteren Transkriptionszyklus rekrutiert und recycelt werden (Svejstrup et al., 1997).

Die Rekrutierung von P-TEFb an den pausierten Elongationskomplex stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Übergangs von arretierter zu produktiver Elongation dar (Lis et al., 2000). Die Regulation des P-TEFb-Komplexes war zentrales Thema der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden näher betrachtet.

2.3 Die Regulation der Transkriptionselongation durch die C-terminale Domäne (CTD) von Pol II Rpb1

Besondere Bedeutung in der Regulation der RNA-Polymerase II fällt dem C-Terminus der größten Untereinheit Rpb1 zu, der sich nahe des Ausgangskanal der neu-synthetisierten RNA aus der Polymerase befindet. Während der Kernbereich aller eukaryotischen RNA-Polymerasen strukturell und funktionell konserviert ist, weicht Pol II von anderen Polymerasen durch eine C-terminale Domäne (CTD) ab, welche aus 52 Wiederholungen des Sequenzmotivs $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ besteht. Auch in anderen Organismen ist dieses Motiv der Pol II erhalten, jedoch variiert die Länge mit der Komplexität des Organismus (Hefe: 26 Wiederholungen, *Drosophila*: 45 Wiederholungen (Egloff und Murphy, 2008)). Die CTD selbst nimmt eine flexible, intrinsisch unstrukturierte Form ein (Bienkiewicz et al., 2000). Diese Flexibilität macht sie zu einer anpassungsfähigen Plattform für die Interaktion mit einer Reihe von regulatorischen Proteinen (Meinhart et al., 2005; Phatnani und Greenleaf, 2006). Jede einzelne Aminosäure der CTD kann posttranslational modifiziert werden. Neben Phosphorylierungen (Ser, Thr, Tyr) treten auch die O-Glycosylierung von Serinen sowie die Isomerisierung der Proline der CTD auf (Dahmus 1996; Kelly et al., 1993, Morris et al., 1999). Dabei nimmt der Phosphorylierungszustand der Serine Ser2, Ser5 und Ser7 eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Transkription ein (zusammengefasst in Abbildung 4): Im unphosphorylierten Zustand kann die CTD mit dem Mediator-Komplex wechselwirken und so eine Rekrutierung der Pol II in den PIC bewirken (Svejstrup et al., 1997; Asturias et al., 1999). Im PIC wird die CTD durch die TFIIH-Untereinheit Cdk7/CycH und die Mediator-Untereinheit Cdk8/CycC an Serin 5 phosphoryliert (Hengartner et al., 1998; Coin und Egly,

1998) und leitet dadurch die Transkriptionselongation ein. Der folgende Elongationsarrest wird durch die Phosphorylierungen der Ser2-Positionen in den Heptadwiederholungen der CTD durch P-TEFb aufgehoben (Marshall et al., 1996), und die Pol II kann das begonnene Transkript elongieren. Ser5 wird währenddessen durch die Phosphatase Scp1 dephosphoryliert.

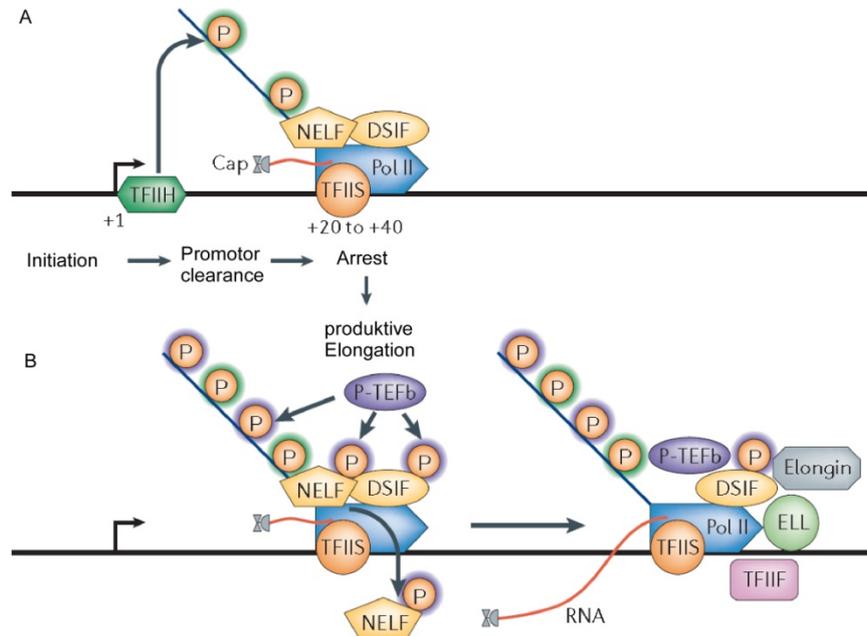


Abbildung 4: P-TEFb überführt Pol II vom Transkriptionsarrest in die produktive Elongation. A) Während der Initiation wird Ser5 von TFIIF phosphoryliert, nach dem Verlassen des Promotors wird der Transkriptionskomplex jedoch durch die Wirkung von DSIF und NELF im arretierten Zustand gehalten. B) P-TEFb hebt den Transkriptionsarrest durch Phosphorylierung von Ser2 der CTD sowie DSIF und NELF auf. NELF dissoziiert von Pol II, und die Elongation des mRNA-Transkripts kann unter Mitwirken von Elongationsfaktoren ELL und Elongin fortlaufen. (nach: Saunders et al., 2006).

Zum Ende des Elongationszyklus wird auch Serin 2 von Fcp1 dephosphoryliert und beide Serine stehen für eine erneute Phosphorylierung wieder zur Verfügung. Kürzlich wurde auch die Phosphorylierung von Ser7 in Hefe durch das Cdk7-Homolog Kin28 beschrieben, welche zusammen mit pSer5 zu Beginn der Transkription auftritt. Die genaue Funktion konnte bisher nicht geklärt werden (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007).

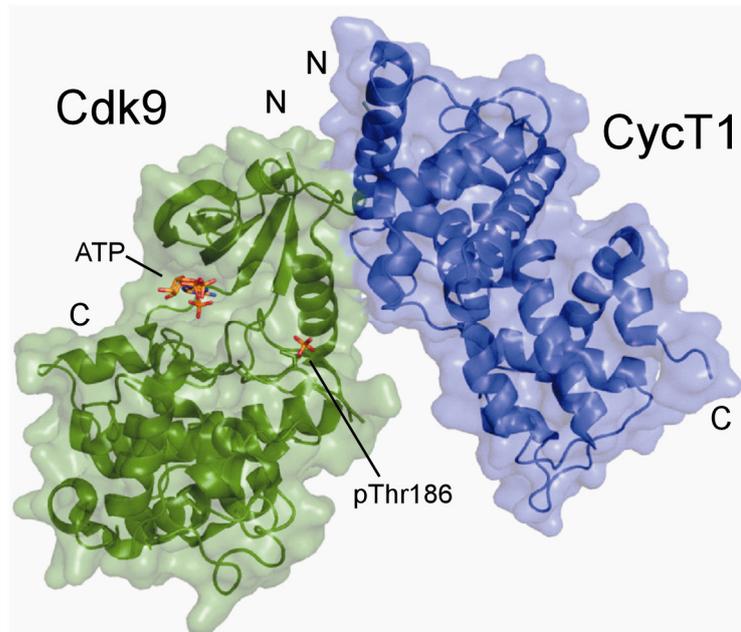
In ihrer phosphorylierten Form bieten beide Serine Ser2 und Ser5 eine Bindungsplattform für das Capping-Enzym (pSer5), die Splicing- und Polyadenylierungsmaschinerie (pSer2) sowie Faktoren zur Termination der Transkription und gewährleisten somit die korrekte Prozessierung und Terminierung der neu-synthetisierten mRNA (McCracken et al., 1997b; Kim et al., 1997; Kim et al., 2004).

2.4 Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb)

Der generelle Transkriptionsfaktor P-TEFb (Abbildung 5) ist in eukaryotischen Zellen für die Überführung der Transkriptionsmaschinerie aus dem EEC zur produktiven Elongation essentiell (Marshall und Price, 1992; Peterlin und Price, 2006). Er besteht aus der Kinase Cdk9 (Cyclin-abhängige Kinase 9, engl.: *Cyclin-dependent kinase 9*) und einer

regulatorischen Cyclin-Untereinheit, meist Cyclin T (Marshall und Price, 1995; Peng et al., 1998b). Cdk9 wurde erstmals 1994 als ubiquitär auftretende Ser/Thr-Kinase mit nukleärer Lokalisation beschrieben (Graña et al., 1994; Garriga et al., 1996) und ist als Mitglied der CDK-Familie abhängig von der Aktivierung durch seinen Cyclin-Partner T1 (kurz: CycT1), T2a, T2b oder selten auch Cyclin K (Wei et al., 1998; Peng et al., 1998a; Peng et al., 1998b). Unabhängig davon wurde sie auch als Tat-aktivierende Kinase (TAK) im Kontext der HIV-Forschung beschrieben (Herrmann und Rice, 1993; siehe 2.4.1). Wichtigstes Substrat von Cdk9 ist die CTD der RNA Pol II Untereinheit-Rpb1, wodurch der Übergang der arretierten Elongation zur produktiven Elongation ermöglicht wird (Peng et al., 1998a; Marshall et al., 1996). Doch auch die Phosphorylierung der negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF-E zur Ablösung dieser Faktoren von Pol II ist ausschlaggebend für die Überführung der Pol II zur Elongation (Fujinaga et al., 2004; Yamada et al., 2006). Die Aktivität von P-TEFb unterliegt selbst ebenso einer strengen Regulation durch die inhibierenden Faktoren Hexim/7SK snRNA (siehe 2.5) sowie dem aktivierenden Protein Brd4 (siehe 2.7).

Abbildung 5: Struktur des P-TEFb-Komplexes. CycT1 (blau) bindet über die N-terminale Cyclin-box an den N-terminalen Bereich von Cdk9 (grün). Zwischen dem N-terminalen und C-terminalen Körper von Cdk9 liegt die ATP-Bindungstasche. Das für die Funktionalität von P-TEFb essentielle phosphorylierte Thr186 (pThr186) liegt nahe dieser Tasche und ist vermutlich für die Koordination des Substrates verantwortlich (PDB: 3BLQ, Baumli et al., 2008).



Kristallstrukturen von Cyclin T1 und P-TEFb geben näheren Aufschluss über die Funktionsweise von Cdk9 und CycT1 (Anand et al., 2007; Baumli et al., 2008). Beide Strukturen enthalten den für die Bindung an Cdk9 ausreichenden N-Terminus von CycT1, welcher aus zwei Cyclinboxen besteht, die allen Cyclinen gemein sind. Von den beiden Cyclinboxen aus je 5 α -Helices interagiert lediglich die N-terminale Cyclinbox mit Cdk9 und weist damit eine im Vergleich zu anderen Cdk/Cyc-Paaren relativ geringe Interaktionsfläche auf. Cdk9 zeigt die typische Kinasefaltung mit einer kleinen C-terminalen und einer großen N-terminalen Domäne auf. Zwischen diesen beiden Bereichen liegt die ATP-Bindungstasche, in welcher das Nukleotid Mg^{2+} -abhängig gebunden wird (Baumli et al., 2008). Wie auch in anderen Cdk9 ist die Phosphorylierung eines Threoninrestes (Thr186 in Cdk9) für die Aktivität der Kinase unerlässlich (Abbildung 5). In Cdk2/CycA ist die Phosphorylierung sowohl für die Interaktion zwischen Kinase und Cyclin als auch für die Substratbindung von entscheidender Bedeutung (Chen et al., 2004; Li et al., 2005; Brown et al., 1999). In Cdk9 scheint Phosphothreonin 186 (pThr186) nicht an der Cyclin-Bindung beteiligt zu sein, sondern

koordiniert durch seine exponierte Position die spezifische Bindung des Substrates durch eine aktivierende Schleife nahe der ATP-Bindungs tasche (Brown et al., 1999; Baumli et al., 2008). Die Phosphorylierung von Thr186 wurde durch *cis*-Autophosphorylierung beschrieben. Drei weiteren C-terminalen Autophosphorylierungsstellen konnte bislang keine Funktion zugeordnet werden (Baumli et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Aspekte der Regulation des P-TEFb-Komplexes untersucht: Zum einen wurde die Stabilisierung der inhibierten Form von P-TEFb durch die Wirkung des Proteins Larp7 betrachtet (siehe 2.5). Zum anderen wurde die Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 und dessen Rekrutierung an Chromatinstrukturen untersucht. Die Regulation der Transkription durch die Wirkung von posttranslationalen Modifikationen der Histone wird im Anschluss unter 2.6 und 2.7 eingeleitet.

2.4.1 Der transaktivierte P-TEFb-Komplex in HIV-1-infizierten Zellen

Auch in der Regulation der Transkription von viralen Genen spielt P-TEFb eine entscheidende Rolle. Das Lentivirus HIV-1 (humanes Immundefizienzvirus 1, engl.: *human immunodeficiency virus*) integriert bei Infektion einer menschlichen T-Zelle sein virales Genom in die Wirts-DNA und verwendet dessen Transkriptions- und Translationsmaschinerie zur Produktion seiner benötigten RNA und Proteine. Durch diesen Replikationszyklus gebildete Viren können ihrerseits gesunde T-Zellen befallen und sind für den Ausbruch des erworbenen Immunschwächesyndroms AIDS (engl.: *acquired immunodeficiency syndrom*) verantwortlich. Die Expression der viralen Proteine und RNA durch die RNA Pol II erfolgt durch die Aktivierung von P-TEFb, welches in diesem Kontext entdeckt wurde (Zhu et al., 1997; Mancebo et al., 1997; Yang et al., 1997; Jones, 1997; Wei et al., 1998). Die zunächst synthetisierte RNA TAR (engl.: *transactivation responsive region*) am 5'-Ende aller viralen Transkripte dient als RNA-basierter Promotor, der durch das virale Protein Tat unterstützt wird. Gemeinsam stimulieren sie die Phosphorylierung der CTD durch P-TEFb zur Überführung der RNA Pol II in die produktive Elongationsphase (Herrmann und Rice, 1995; Zhu et al., 1997; Isel und Karn, 1999). Die Transkriptionsaktivierung erfolgt jedoch durch eine direkte Interaktion von Tat mit den Cyclinboxen von CycT1 (Garber et al., 1998). Diese Interaktion wird durch die kooperative Bindung der 59 nt langen TAR RNA an Tat und CycT1 zu einer hochaffinen Bindung (K_d im nanomolaren Bereich) verstärkt (Wei et al., 1998; Zhang et al., 2000). Ein intermolekularer Zinkfinger zwischen Tat und CycT1 definiert die Spezifität der Interaktion (Garber et al., 1998; Bieniasz et al., 1998; Wimmer et al., 1999). Die Kristallstruktur des CycT1/Tat/TAR-Komplexes des HIV-1 Orthologs aus dem Pferd (EIAV, engl.: *equine infectious anemia virus*) lieferte die Erklärung für die Exklusivität der Bindung an CycT1, während T2a/b ausgeschlossen werden (Wimmer et al., 1999; Anand et al., 2008): In dieser Struktur nimmt Tat eine helikale Faltung ein und interagiert mit der großen Furche der TAR-Haarnadelschleife. Die Interaktion mit CycT1 erfolgt an einer Schleife zwischen den Helices 4 und 5 der ersten Cyclinbox von CycT1, deren Sequenz in CycT2 deutlich von der von CycT1 und anderen C-Typ Cyclinen abweicht und damit die Spezifität der Bindung zwischen Tat und CycT1 erklärt (Anand et al., 2007; Anand et al., 2008). Trotz dieser Einblicke in die Struktur von CycT1/Tat/TAR ist der Mechanismus, mit welchem Tat/TAR die Phosphorylierung durch Cdk9 beeinflussen, weiterhin unklar. Auch

eine Erweiterung der Substratspezifität von P-TEFb von Ser2 auf Ser2/Ser5 durch Tat ist aufgrund der fehlenden Charakterisierung der Bindungsstelle auf Cdk9 bis heute nicht verstanden (Zhou et al., 2000). Eine Deaktivierung der Transkriptionsaktivierung wird durch Acetylierung von Tat an Lys50 durch die Acetyltransferasen p300 und PCAF erreicht, die eine Dissoziation von TAR bewirkt (Kiernan et al., 1999; Kaehlcke et al., 2003).

2.5 Die Regulation von P-TEFb durch den 7SK snRNP-Komplex

2.5.1 Hexim1/2 und die 7SK snRNA

2001 wurde bei der Isolierung von P-TEFb aus Hela-Zellen beobachtet, dass nur etwa 50% des durch Ultrazentrifugation erhaltenen P-TEFb's die volle Kinaseaktivität aufwies. Neben dieser aktiven Form konnte auch eine weitere P-TEFb-enthaltende Fraktion isoliert werden, die eine größere Masse und eine stark-reduzierte Kinase-Aktivität aufwies. In diesem inaktiven Komplex konnte die kleine nukleäre RNA (snRNA, engl: *small nuclear RNA*) 7SK nachgewiesen werden (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001). Die 7SK snRNA war schon seit 25 Jahren als stabile, zytoplasmatischen RNA von 331 Nukleotiden bekannt (Zieve und Penman, 1976; Ullu et al., 1982), ohne ihr eine Funktion zuordnen zu können (Wassarman und Steitz, 1991). Später wurde ihre Länge auf 332 Nukleotide korrigiert (Locus NC_000006). Mit 2×10^5 Molekülen pro Zelle ist sie eine der häufigsten snRNAs, die von RNA Pol III synthetisiert wird (Zieve et al., 1977; Wassarman und Steitz, 1991). 7SK inhibiert P-TEFb jedoch nicht direkt, sondern dient als Gerüst für die Interaktion des HMBA-induzierbaren Proteins und potentiellen Tumorsuppressors Hexim1 (engl: *Hexamethylene-bisacetamid-inducible protein 1* (Kusuhara et al., 1999; Ouchida et al., 2003; Wittmann et al., 2003; Byers et al., 2005; Yik et al., 2004)) oder dessen Homolog Hexim2 mit den P-TEFb-Untereinheiten Cdk9 und Cyclin T1 (Abbildung 6; Michels et al., 2003; Yik et al., 2003).

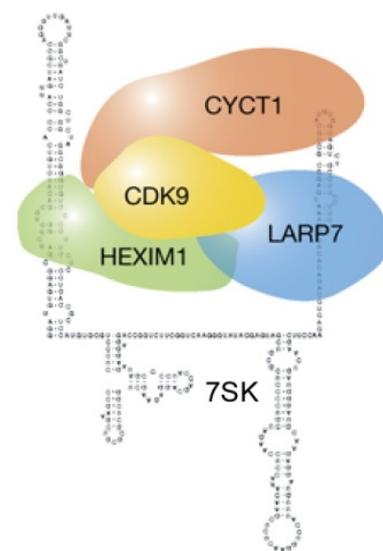


Abbildung 6: Zusammensetzung des 7SK snRNP. Die 7SK snRNA dient als Gerüst des 7SK snRNP und unterstützt die inhibierte Form des P-TEFb-Komplexes. Dabei interagiert das 5'-Ende der RNA mit Larp7, während das 3'-Ende als Ankerpunkt für Hexim1 beschrieben wurde. Das Capping-Enzym MePCE ist hier nicht dargestellt, es katalysiert die Capping-Reaktion der 7SK RNA am 5'-Ende.

Dieses 7SK-Gerüst bietet in einer apikalen, 3'-Schleife eine Bindefläche für P-TEFb, während an der Spitze der distalen und größeren 5'-Schleife eine Interaktionsfläche mit Hexim geboten wird (Wassarman und Steitz, 1991; Egloff et al., 2006). 7SK verstärkt durch die strukturelle Organisation die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb (Michels et al., 2004; Egloff et al., 2006; Bélanger et al., 2009).

Die Interaktion von 7SK und Hexim1, welche essentiell für die Formierung des 7SK snRNP (engl.: *small nuclear ribonucleoprotein complex*) ist, wird sowohl über ein basisches Motiv

(Aa 150-165), das als nukleäres Lokalisationssignal (NLS) wirkt, als auch einen kurzen Bereich C-terminal davon vermittelt (Yik et al., 2004; Michels et al., 2004; Barboric et al., 2005; Bélanger et al., 2009). Der genaue Mechanismus der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. So wurde die Bindung eines Tyrosinrestes in die ATP-Bindungstasche der Kinase, vergleichbar zur Inhibition von Cdk2/CycA durch p27^{Kip} (Jeffrey et al., 2000), vorgeschlagen (Michels et al., 2004; Li et al., 2005). Auch Threonin- und Phenylalaninreste von Hexim1 sind für die Interaktion notwendig, deren Rolle jedoch ungeklärt ist (Michels et al., 2004; Li et al., 2005; Czudnochowski, 2009). Die Interaktion von Hexim mit P-TEFb wird über ein flexibles C-terminales Coiled-Coil-Segment vermittelt, welches eine Dimerisierung von zwei Hexim1- und Hexim2-Molekülen bewirkt (Dames et al., 2007; Schonichen et al., 2010). Dieses Segment ermöglicht eine RNA-unabhängige Bindung von Hexim an die N-terminalen Cyclin-Boxen von CycT, wobei die bestimmten Affinitäten der Interaktionen auf eine Bevorzugung von Hexim1-CycT1- und Hexim2-CycT2-Paaren deuten (Michels 2003; Michels et al., 2004; Schulte et al., 2005; Dames et al., 2007, Czudnochowski et al., 2010). Für die Assoziation von P-TEFb mit Hexim/7SK ist die Phosphorylierung von Cdk9 an Thr186 essentiell (Chen et al., 2004; Li et al., 2005). Vor kurzem wurden zwei weitere Proteine identifiziert, welche in einer proteomischen Studie als Interaktionspartner von P-TEFb und 7SK gefunden wurden. Das Protein Larp7 stellt einen permanenten Bestandteil des 7SK snRNP dar und wird unter 2.5.2 genauer beschrieben. Das Capping-Enzym MePCE (Methylphosphat-Capping Enzym, engl.: *7SK methylphosphate capping enzyme*) ist eine konservierte Methyltransferase, die eine Methylgruppe unter Verwendung des Cofaktors S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf die 5'- γ -Phosphatgruppe der 7SK snRNA überträgt und sie dadurch vor dem Abbau durch Exonucleasen schützt (Gupta et al., 1990; Jeronimo et al., 2007).

Zellulär liegt P-TEFb etwa zur Hälfte in freier, aktiver Form vor, während die andere Hälfte durch die Bildung des 7SK snRNP aus P-TEFb, Hexim1/2, Larp7 und der 7SK RNA inaktiv gehalten wird. Dieses Gleichgewicht kann durch äußere Einflüsse wie Stress-induzierende Faktoren zugunsten des aktiven Komplexes beeinflusst werden (Nguyen et al., 2001). Andere Faktoren wie die Induktion der Hexim-Expression durch HMBA verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des inhibierten Komplexes (Ouchida et al., 2003; Zhou und Yik, 2006). 7SK, die nicht mit P-TEFb assoziiert ist, kann ihrerseits mit anderen zellulären Faktoren wie den RNPs hnRNP A1, A2/B1, R und Q interagieren und damit dem Gleichgewicht zwischen freiem und 7SK-gebundenem P-TEFb entzogen werden (Van Herreweghe et al., 2007). Die globale Regulation der Assoziation und Dissoziation von Hexim/7SK und P-TEFb als Reaktion auf äußere Einflüsse und Bedürfnisse der Zelle sind bis heute jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (He et al., 2006).

2.5.2 Larp7 als Stabilisator der 7SK snRNA

Bei der Untersuchung von mit P-TEFb oder 7SK-präzipitierenden Komponenten wurde 2008 in drei unabhängigen Studien Larp7 (La-verwandtes Protein 7, engl.: *La-related-protein 7*) als zusätzlicher Bestandteil des 7SK snRNP identifiziert (Krueger et al., 2008; He et al., 2008; Markert et al., 2008). Dieses 582 Aminosäuren umfassende eukaryotische Protein war in Expressionsstudien an Gebärmutterhalskrebszellen als eines von zwei Proteinen gefunden

worden, deren Expression in den metastasierenden Zellen reduziert war (Biewenga et al, 2007). Unter der Bezeichnung DKFZP564K112 wurde es zudem als potentieller Tumormarker in Magenkrebszellen aufgrund von vermehrt auftretenden Mutationen beschrieben (Mori et al, 2002). In derselben proteomischen Studie, bei der die Interaktion von MePCE mit der P-TEFb-Transkriptionsmaschinerie untersucht wurde, wurde Larp7 in Zusammenhang mit Cdk9 und MePCE gebracht (Jeronimo et al., 2007). Es wurde eine direkte Interaktion zwischen dem nukleoplasmatischen Larp7 und der 7SK snRNA festgestellt, welche auch bei Lösung von 7SK von P-TEFb durch Stressfaktoren oder Inhibitoren bestehen bleibt. Larp7 tritt nur in der inhibierten Form des P-TEFb-Komplexes auf, während Brd4 als Marker des aktiven P-TEFb-Komplexes betrachtet und nie gleichzeitig mit Larp7 an P-TEFb gefunden wird (He et al., 2008, siehe auch Abschnitt 2.7).

Larp7 gehört zur Familie der La-verwandten Proteine (Larps) und entspricht der familienspezifischen Domänenstruktur (Abbildung 7; Wolin und Cedervall, 2002; Details zum La-Protein unter 2.5.3). Eine N-terminale La-Domäne ist allen La-Proteinen gemein und wurde für La als entscheidende RNA-Bindungsdomäne identifiziert (Ohndorf et al., 2001; Horke et al., 2004). Auch ein zentrales und ein C-terminales RNA-Erkennungsmotiv (RRM, engl.: *RNA recognition motif*) findet sich in beiden Proteinen (RRM1 bzw. RRM3).

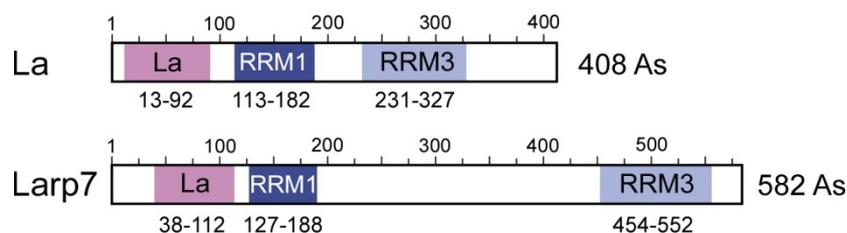


Abbildung 7: Domänenarchitektur von La und Larp7. Die beiden Proteine weisen N-terminal die namensgebende La-Domäne auf, welche zusammen mit der benachbarten RRM1-Domäne in La die Interaktion mit UUU_{OH} -RNAs vermittelt. Die Funktion des C-terminalen RRM3 ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Die Erkennung und Bindung der 7SK snRNA durch Larp7 erfolgt über die N-terminalen La- und RRM1-Domänen und ist damit in Übereinstimmung mit dem Bindemechanismus von La (Teplova et al., 2006; Kotik-Kogan et al., 2008). Als Erkennungsmotiv auf der 7SK snRNA konnte in Analogie zu La ein Polyuridin-Motiv (UUU_{OH}) am 3'-Ende der RNA identifiziert werden (He et al., 2008; Markert et al., 2008), welches allen Pol III-synthetisierten RNAs gemein ist (Stefano, 1984; Mathews und Francoeur, 1984). Wird dieses PolyU-Motiv der RNA deletiert, wird die Interaktion mit Larp7 deutlich geschwächt (He et al., 2008; Markert et al., 2008). Von entscheidender Bedeutung scheint dabei die La-Domäne zu sein, da schon eine einfache Punktmutation Y127D die Interaktion mit der RNA unterbindet (He et al., 2008). Durch die Bindung von Larp7 an das 3'-Ende der RNA wird diese stabilisiert und vor dem Verdau durch Exonukleasen geschützt. Eine Deletion von Larp7 bewirkt eine annähernd vollständige Reduktion von 7SK. Da Larp7 an der Stabilisierung des 7SK snRNPs beteiligt ist, verursacht eine Deletion von Larp7 auch eine Steigerung der Transkriptionsaktivierung durch Tat in einem LTR-basierenden Transkriptionsassay (Krueger et al., 2008; He et al., 2008).

Bezüglich der direkten Interaktion von Larp7 mit anderen Proteinen des snRNP wurden widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Während einerseits bei RNase-Behandlung des snRNP-Komplexes durch immobilisiertes Larp7 kein anderes Protein an Larp7 gebunden blieb (He et al., 2008), wurde in anderen Experimenten eine direkte Interaktionen zwischen Larp7 zu Hexim1, MePCE sowie Cdk9 beschrieben (Markert et al., 2008; Xue et al., 2009). Eine genauere biochemische Untersuchung von Larp7 und seiner Domänen erfolgte bislang nicht und wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführt.

2.5.3 Das La Protein als Beispiel eines Larp7-verwandten Proteins

Bisher wurden keine Kristall- oder NMR-Strukturen von Larp7 veröffentlicht. Rückschlüsse auf die Struktur sowie die Interaktion mit der 7SK snRNA lassen sich allerdings aufgrund der Verwandtschaft zu La ziehen, welches gut charakterisiert wurde. La wurde ursprünglich als Hauptautoantigen in der rheumatischen Autoimmunerkrankung Lupus Erythematodes und dem Sjogrens Syndrom identifiziert. Bald zeigte sich, dass La ubiquitär in eukaryotischen Zellen in hoher Anzahl auftritt ($2 \cdot 10^7$ Kopien pro Zelle) und als erstes Protein mit Transkripten der RNA Pol III interagiert. Es bindet und stabilisiert die RNAs direkt nach der Synthese über deren 3'-Polyuridin-Sequenz (UUU_{OH}) und schützt sie vor dem unspezifischen Abbau durch Exonukleasen (Ohndorf et al., 2001; Horke et al., 2004).

Die La-Domäne zeigte in Kristallstrukturen eine α -helikale Faltung mit drei kurzen, antiparallelen β -Faltblättern, die eine sogenannte *winged-helix-turn-helix*-Faltung aufweisen (Dong et al., 2004; Alfano et al., 2004; Gajiwala und Burley, 2000, Abbildung 8).

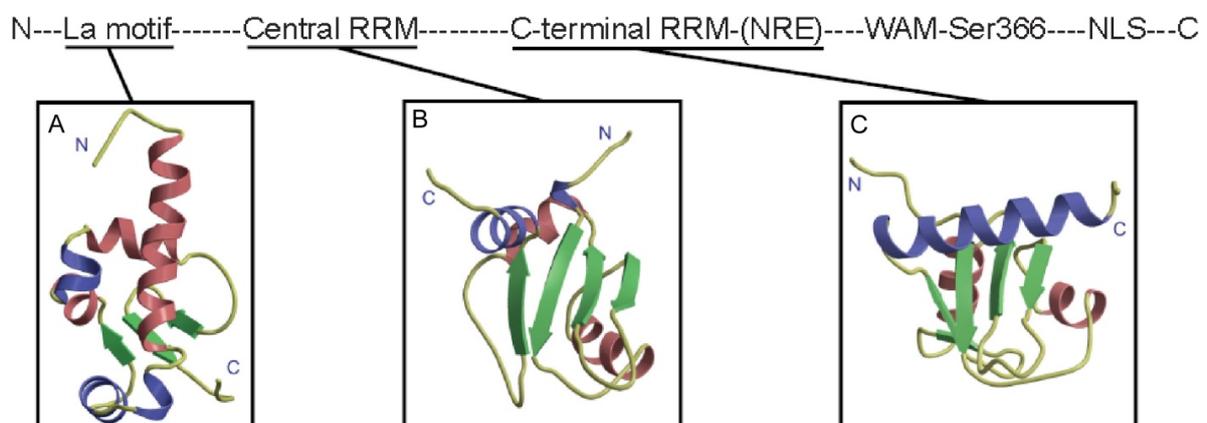


Abbildung 8: Strukturen der Domänen von La. A) Ein N-terminales La-Motiv zeigt eine typische *winged-helix-turn-helix*-Faltung mit zentralen β -Faltblättern, umgeben von α -Helices. B) Das zentrale RRM1 entspricht der konservierten RRM-Faltung, wovon C) das RRM3 leicht abweicht. La und RRM1 binden UUU_{OH} -Enden von Pol III-Transkripten, während die Funktion von RRM3 umstritten ist. (nach Kenan und Keene, 2004).

Der zentrale RRM1 entspricht der klassischen RRM-Faltung aus α -Helices um vier zentrale β -Faltblätter (Alfano et al., 2004). Sowohl die La- als auch die RRM1-Domäne sind alleine nicht zu spezifischer RNA-Bindung fähig (Dong et al., 2004; Alfano et al., 2004) und sind gemeinsam an der Bindung von RNAs beteiligt (Teplova et al., 2006; Kotik-Kogan et al., 2008). Dabei sind einzig die 3'-Uracile und im speziellen das vorletzte Uracil des UUU_{OH} -Endes der RNA für eine korrekte Positionierung essentiell sind und werden basenspezifisch konserviert gebunden (Teplova et al., 2006; Kotik-Kogan et al., 2008).

Die am wenigsten konservierte RRM3-Domäne scheint in La nicht essentiell für die Bindung von UUU_{OH}'s zu sein, es wurde jedoch über eine zusätzlich RNA-Bindung der ppp-Phosphate des 5'- Endes der RNA spekuliert (Maraia und Intine, 2001). Eine strukturelle Studie zeigte eine größtenteils gefaltete, monomere Domäne, welche sich aus 5 β -Faltblättern mit einer langen, darüber liegenden Helix ähnlich zu anderen RRMs faltet (Jacks et al., 2003). RRM3 interagiert nur sehr schwach mit UUU_{OH}-RNA (Jacks et al., 2003) und liegt in isolierter Form monomer vor. Dies könnte jedoch auf die Verkürzung der für die Dimerisierung nötigen Domäne (Aa 226-348) zurückzuführen sein (Jacks et al., 2003; Craig et al., 1997).

2.5.4 Die Überführung von P-TEFb in den aktiven Zustand durch Brd4

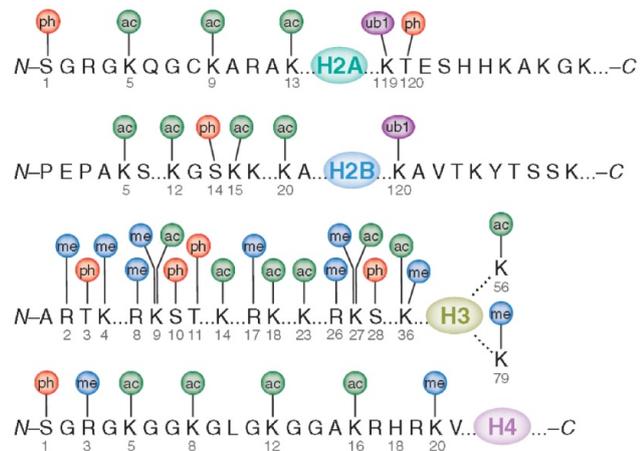
Trotz der zahlreichen Erkenntnisse zur Regulation des inhibierten und des transaktivierten P-TEFb-Komplexes durch 7SK, Hexim1, Larp7 und MePCE oder Tat/TAR konnte die Überführung des P-TEFb-Komplexes in einen aktiven Zustand erst mit der Entdeckung des Bromodomänen-enthaltenden Proteins 4 (engl.: *Bromodomain-containing protein 4*) erklärt werden (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Brd4 assoziiert exklusiv mit der aktiven Form von P-TEFb und fördert dessen transkriptionsaktivierende Wirkung (Bisgrove et al., 2007). Gleichzeitig kann es über zwei N-terminale Bromodomänen mit acetylierten Lysin auf Histonen interagieren (Dey et al., 2003). Damit scheint Brd4 der entscheidende Faktor zu sein, der die Rekrutierung von P-TEFb zur Transkriptionsstelle in Abhängigkeit des posttranslationalen Modifikationsstatus der Histone ermöglicht. Zum genaueren Verständnis der Wirkungsweise von Brd4 soll im Folgenden (2.6) daher die Regulation der Histone durch posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung (2.6.1) und die Erkennung der Modifikationen durch beispielsweise Bromodomänen (2.6.3) beschrieben werden.

2.6 Posttranslationale Modifikationen in Histonen

Wie unter 2.1 beschrieben, liegt die DNA im eukaryotischen Zellkern in hochkondensierter Form vor. In der ersten Kondensationsstufe, den Nukleosomen, wird die DNA um einen Proteinkomplex aus acht Histonen gewunden (Kornberg, 1974, siehe auch Abbildung 1). In ihrer nukleosomgebundenen Form ist die DNA daher schwer zugänglich für DNA-bindende Proteine, wie DNA-Remodelling Komplexe und Transkriptionsfaktoren und kann nicht zur Genexpression genutzt werden (Owen-Hughes und Workman, 1994). Von zentraler Bedeutung für die Transkription der DNA sind aus diesem Grund die ungefalteten N-terminalen Bereiche der Histone, die eine Manipulation der Struktur der Nukleosomen ermöglichen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Anzahl von posttranslational-modifizierbaren Aminosäuren wie Lysin und Arginin aus (Abbildung 9). In unmodifizierter Form unterstützen diese Reste aufgrund ihrer positiven Ladung die Interaktion mit der negativ geladenen DNA sowie die Interaktionen von Histonen unterschiedlicher Nukleosomen miteinander (Fletcher und Hansen, 1995). Werden sie jedoch modifiziert, können sie zur Ablösung der DNA vom Nukleosom und der Bindung und Funktionalität anderer Proteine

beitragen. Auch die Modifikation von Serinen durch Phosphorylierung führt durch Einfügung der Phosphatgruppen zu einer Lösung der ebenfalls negativ-geladenen DNA von Histonen.

Abbildung 9: Posttranslationale Modifikationen der Histone. Die N-Termini der Histone H2A/B, H3 und H4 weisen hochgradige posttranslationale Modifikationen auf. Besonders häufig sind Acetylierungen und Methylierung von Lysinen, aber auch die Phosphorylierung und Ubiquitylierung sind von Bedeutung für die Manipulation der Histone durch diese Modifikationen. (Bhaumik et al., 2007).



1964 wurde erstmals die Acetylierung und Methylierung von Histonproteinen und daraus folgende Veränderungen des Transkriptionsverhaltens einer Zelle beschrieben (Allfrey et al., 1964). Die Acetylierung von Lysinen und die Methylierung von Lysinen und Argininen scheinen die am häufigsten vorkommenden und bis heute die am besten charakterisierten Histonmodifikationen zu sein und werden im Folgenden genauer betrachtet. Ebenfalls beschrieben wurden Phosphorylierungen, Citrullin/Deiminierung, Biotinylierung, Ubiquitylierungen und SUMOylierungen, ADP-Ribosylierungen und Prolinisomerisierungen einzelner Histonreste. Da diese Modifikationen sowohl einzeln als auch in Kombination wirken können, etablierte sich der Begriff des „Histone Codes“ für dieses Phänomen (Abbildung 8; Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001).

2.6.1 Die Acetylierung von Histonen

Während in Nicht-Histon-Proteinen vor allem die co-translationale, nicht reversible Acetylierung der α -Aminofunktion des N-Terminus eines Proteins auftritt (Walsh, 2006), ist in Histonen die Acetylierung an der Seitenkette von Lysinen von zentraler Bedeutung (Gershey et al., 1968). Sie wurde schnell mit der Aktivierung der Genexpression in Verbindung gebracht. Im unmodifizierten Zustand vermitteln die Lysinseitenketten die Interaktionen der DNA und der Histone, indem sie durch ihre positive Ladung die negative Ladung der Phosphate der DNA neutralisieren und die Ausbildung von Salzbrücken begünstigen. Durch Acetylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysines wird diese Ladung aufgehoben und die Interaktionen zwischen Lysin und DNA werden geschwächt. Dies macht die DNA zugänglicher für DNA-bindende Proteine, die Einfluss auf die Genregulation nehmen können. Die Acetylierung von Lysinen wird generell mit erhöhter Transkriptionsaktivität korreliert, während die Deacetylierung meist mit der Verminderung oder Unterdrückung der Transkription einhergeht (Hebbes et al., 1988; de Ruijter et al., 2003).

2.6.2 Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs)

Wie die meisten Histonmodifikationen ist die Acetylierung von Lysinen reversibel. Die kovalente Übertragung eines Acetylrestes auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysines zur Bildung

eines Acetyllysins wird von Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert. Als Acetyldonor dient das Co-Substrat Acetyl-Coenzym A (CoA), welches im Körper hauptsächlich als Kohlenstoffquelle für den Citratzyklus dient. Es spielt außerdem eine bedeutende Rolle in der Synthese und dem Abbau von Fettsäuren. Trotz ihres Namens können HATs auch Nicht-Histonproteine acetylieren, beispielsweise wurde p53 als Substrat für p300 identifiziert (Gu und Roeder, 1997). Als Antagonisten zu HATs sind Histone-Deacetylasen (HDACs) in der Lage, die ϵ -Acetylgruppe von Acetyllysinen zu entfernen und das Lysin in seinen ursprünglichen Zustand zurückzusetzen.

Sowohl HATs als auch HDACs werden auffällig oft in Proteinen oder Proteinkomplexen mit einer oder mehreren Histon-interagierenden Domänen gefunden. Die Rekrutierung der Proteine zur Acetylierungs- bzw. Deacetylierungsstelle hängt dabei von anderen Domänen wie Chromo- oder Bromodomänen ab, erst korrekt positioniert können HATs und HDACs katalytisch wirken. Diese spezifische Rekrutierung durch andere Domänen würde auch erklären, wie HATs oder HDACs, die eine relativ breite Substrattoleranz zeigen, trotzdem spezifisch einzelne Lysine acetylieren bzw. deacetylieren können (Lee und Workman, 2007).

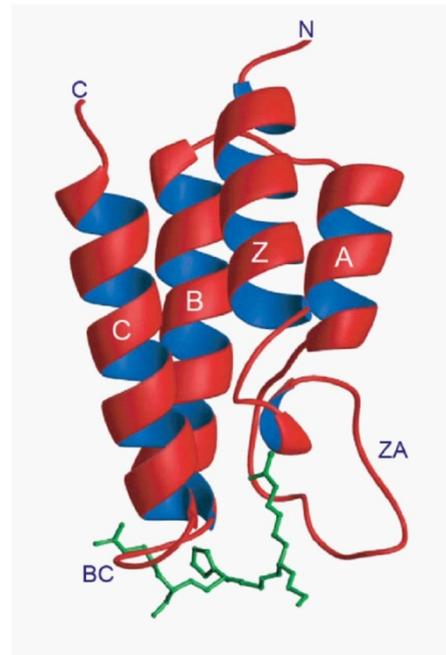
2.6.3 Bromodomänen als Acetyllysine-Bindungsdomänen

Wie bereits erwähnt führt die Veränderung der Ladung eines Lysins durch Acetylierung zur Abschwächung der direkten Interaktionen mit der DNA. Es zeigte sich jedoch bald, dass posttranslationale Modifikationen auf Histonen auch als Erkennungs- und Bindeplattform für andere Proteine und Proteinkomplexe dienen (Kouzarides, 2007). So können Phosphoserine auf Histonen von 14-3-3-Proteinen erkannt werden, methylierte Lysine werden von Chromo- und Tudordomänen gebunden (Kouzarides, 2007).

Als Interaktionsdomäne für ϵ -Acetyllysine wurde 1992 eine Domäne unbekannter Funktion des Drosophila-Gens *brahma* identifiziert, welche in Analogie zu Chromodomänen (engl: *chromatin organisation modifier*; Pearce et al., 1992) und dem ursprünglichen Gen als Bromodomäne (BD) beschrieben wurde (Tamkun et al., 1992; Haynes et al., 1992). Ihre Funktion blieb zunächst unklar, doch ein gehäuftes Auftreten von ein oder zwei Bromodomänen in Transkriptionscoaktivatoren und HAT-Komplexen legten eine Funktion in der nukleären Lokalisation nahe (Jeanmougin et al., 1997). Erst 1999 konnte der Zusammenhang zu acetylierten Lysinen hergestellt werden, als die Assoziation der Bromodomänen-enthaltenden HAT Gcn5 durch seine Bromodomänen an Acetylierungsstellen auf Histon H4 erkannt wurde (Ornaghi et al., 1999; Winston und Allis, 1999). Bald darauf wurden eine Reihe von NMR- und Kristallstrukturen von Domänen größerer HAT-Komplexe veröffentlicht, die eine konservierte Bromodomänenfaltung zeigten (Dhalluin et al., 1999; Hudson et al., 2000; Jacobson et al., 2000). Bromodomänen umfassen etwa 110 Aminosäuren, welche aus vier α -Helices (αZ , αA , αB und αC) die Kernstruktur des Proteins formen (Abbildung 10). Diese Bündel der Anordnung auf-ab-auf-ab besitzt eine distal zum N- und C-Terminus liegende, hydrophobe Tasche, die von zwei kurzen Schleifen (ZA- und BC-Schleife) eingegrenzt wird und die Bindungsfläche für acetylierte Lysine im Histonkontext bildet. Insgesamt weisen eukaryotische Bromodomänen eine Konservierung von etwa 30% untereinander auf. Die verbindenden Schleifen ZA und BC sind dabei weit weniger konserviert als die Aminosäuren der Bindungstasche und können in Länge und Sequenz variieren.

Mittlerweile wurden Bromodomänen in mehr als 40 Proteinen gefunden, meist einzeln oder doppelt vorkommend, in seltenen Fällen wie im Fall von Polybromo-1 (Pb1) bis zu sechsfach auftretend (Horikawa und Barrett, 2002). Bemerkenswerterweise werden Bromodomänen oft als Teil von Multidomänenproteinen oder Multiproteinkomplexen gefunden. So enthalten Proteine der Gcn5/PCAF und p300/CBP-Familien jeweils HAT- und Bromodomänen, die Unter-einheit TAF_{II}250 des Transkriptionsfaktor TFIID beinhaltet eine HAT- und eine Kinasedomäne sowie zwei Bromodomänen (Sterner und Berger, 2000). Dies legt nahe, dass Bromo-domänen für die Bindung und die korrekte Positionierung von katalytischen Domänen auf den Histonen verantwortlich sind und kooperativ mit anderen Domänen wirken können (Marmorstein und Berger, 2001).

Abbildung 10: Kristallstruktur der Bromodomäne von Gcn5 mit acetylierten H4-Peptid. Vier α -Helices α Z, α A, α B und α C bilden den Bromodomänenkörper, welcher distal eine hydrophobe Bindungstasche zwischen den Schleifen ZA und BC aufweist. In diese Tasche bindet ein H4-Histonpeptid über ein Acetyllysin an Position 16 (nach Zeng und Zhou, 2002).



Aufschluss über die Funktionsweise von Bromodomänen als Acetyllysinbindungsdomänen gab 2000 die Kristallstruktur der Bromodomänen von Gcn5 aus *S. cerevisiae*, welche in Komplex mit einem Peptid gelöst wurde, dass der Sequenz des Histon H4 entspricht und ein acetyliertes Lysin an Position 16 trägt (Abbildung 10; Owen et al., 2000). Es zeigte sich eine direkte Interaktion mit dem Sauerstoff der Acetylcarbonylgruppe über ein in allen Bromodomänen konserviertes Asparagin (N407 in scGcn5). Andere konservierte Reste der Bindungstasche wie P351 und Y364 interagieren nur indirekt über ein Netzwerk von Wassermolekülen innerhalb der Tasche mit dem Acetyllysin.

Die Frage nach der Spezifität von Bromodomänen konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. Freies Acetyllysin bindet nur äußerst schwach an Bromodomänen (Hudson et al., 2000) und strukturelle Analysen sowie Ligandenbindungsstudien weisen auf eine Beteiligung der umgebenden Aminosäuren an der Bindung hin. In Gcn5 und PCAF erscheinen Reste an Position +2 und +3 relativ zu Acetyllysin mit verantwortlich für die Interaktion mit dem Histonpeptid zu sein, bei CBP binden Reste an den Positionen ± 1 und ± 2 an die äußere Bindungstasche (Owen et al., 2000; Zeng et al., 2008). Eine allgemein gültige Konsensussequenz ist bis heute nicht bekannt. Bestimmungen der Bindungsstärke von Bromodomänen und acetylierten Lysinpeptiden zeigten schwache Affinitäten mit Dissoziationskonstanten (K_d 's) im micro- bis millimolaren Bereich (Dhalluin et al., 1999; Hudson et al., 2000; Shen et al., 2007; Zeng et al., 2008). Bis heute ist die Bromodomäne die einzige bekannte Interaktionsdomäne für Acetyllysin (Zeng und Zhou, 2002; Mujtaba et al., 2007). Auch Nicht-Histon-Proteine können von Bromodomänen gebunden werden wie beispielsweise das HIV-1 Tat Protein, welches von p300 und PCAF acetyliert wird und anschließend über deren Bromodomänen mit ihnen interagiert (Hottiger und Nabel, 1998;

Kiernan et al., 1999; Ott et al., 1999, Zeng et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde das Bromodomänen-enthaltende Protein Brd4 untersucht, welches unter 2.7 näher beschrieben wird.

2.6.4 Methylierung und Citrullierung von Histonen

Während Modifikationen wie Acetylierung nur an einer einzigen Aminosäure (Lysin) auftreten, können Methylierungen sowohl an Lysinen als auch an Argininen erfolgen (Walsh, 2006). Im Gegensatz zur Acetylierung wurde die Methylierung jedoch sowohl mit der Aktivierung als auch mit der Repression der Transkription in Zusammenhang gebracht (Bannister und Kouzarides, 2005). Methylierungen auf Histonen werden von einer Reihe von Domänen wie u.a. Chromo-, Tudor- und MBT-Domänen erkannt, die als „*Royal family*“ bezeichnet werden (Kouzarides, 2007).

Während eine Reihe von Methyltransferasen und Demethylasen bekannt sind, die die kovalente Übertragung und Entfernung von 1 bis 3 Methylgruppen an Lysinen vermitteln (Mono-, Di- und Trimethylierungen; Kouzarides, 2007; Tsukada et al., 2006; Hausinger, 2004), sind weit weniger Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) und nur eine Arginin-Demethylase bekannt (Chang et al., 2007). Vor deren Entdeckung wurde die Citrullierung oder Deiminierung von Arginin als Gegenreaktion zur Methylierung diskutiert, bei der ein Stickstoffatom der Guanidinogruppe zu Sauerstoff durch Protein-Arginin-Deiminasen (PADIs) hydrolysiert wird. Durch den Austausch der Aminogruppe zu Sauerstoff (Deiminierung) wird der stark basische Charakter von Arginin abgeschwächt und erinnert an die ungeladenen Aminosäuren Asparagin und Glutamin (Vossenaar et al., 2003; György et al., 2006). Damit kehren Deiminasen einerseits die Monomethylierung von Arginin durch Umwandlung in Citrullin um, gleichzeitig verhindern sie durch Citrullierung die Methylierung anderer Arginine (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Bislang wurde keine Proteindomäne beschrieben, die Citrullin bindet, und es wurde in der vorgelegten Arbeit überprüft, ob Bromodomänen für die Erkennung von Citrullin verantwortlich sein könnten.

2.6.5 Propionylierung und Butyrylierung als neue Modifikation in Histonen

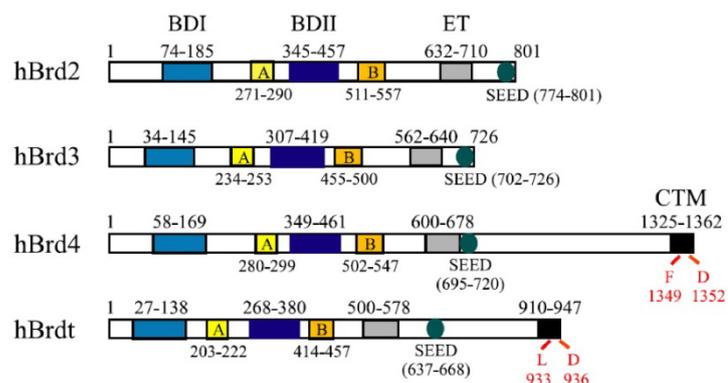
2007 wurden in einer proteomischen Studien an humanen Histonpeptiden per Massenspektrometrie sowohl die Propionylierungen als auch die Butyrylierung von Lysinen gefunden (Chen et al., 2007). Es wurden drei Propionylierungsstellen (K5, K8 und K12) sowie zwei Butyrylierungsstellen (K5 und K12) auf Histon H4 identifiziert, auf Histon H3 wurde K23 propionyliert gefunden (Liu et al., 2009). Diese Modifikationen konnten ebenso auf Hefehistonen nachgewiesen und um weitere Lysine in den Histonen H3, H2A und H2B ergänzt werden (Zhang et al., 2009). Auch Nicht-Histon-Proteinen wie p53 konnten *in vivo* und *in vitro* propionyliert und butyryliert nachgewiesen werden (Chen et al., 2007; Cheng et al., 2009). *In vitro* konnte zudem gezeigt werden, dass die Histon-Acetyltransferasen CBP und p300 zur Übertragung von Propionyl- und Butyryl-CoA befähigt sind. Auch PCAF überträgt Propionyl-CoA auf ein Histonsubstrat, wenn auch mit sechsfach geringerer Substrat-Affinität k_{cat}/K_m (Chen et al., 2007, Leemhuis et al., 2008). Propionyllysine und Butyryllysine werden zudem von verschiedenen HDACs als Substrat akzeptiert (Smith und Denu, 2007). Eine Erkennungsdomäne konnte bislang nicht identifiziert werden, jedoch wurde aufgrund der

Analogie zur Acetylierung eine Erkennung durch Bromodomänen erwogen (Leemhuis et al., 2008). Dies sollte in dieser Arbeit anhand des P-TEFb-aktivierenden Proteins Brd4 (2.7), welches zwei Bromodomänen enthält, untersucht werden.

2.7 Das Bromodomänen-enhaltende Protein 4 (Brd4)

Brd4 gehört zur Familie der BET-Proteine (**B**romodomänen und **ET**-Domäne), welche zwei N-terminale Bromodomänen aufweisen, sowie eine extraterminale (ET) Domäne, deren Funktion trotz vorhandener NMR-Struktur bislang nicht geklärt wurde (Abbildung 11; Dey et al., 2000; Lin et al., 2008). C-terminal der ET-Domäne tragen BETs eine SEED-Domäne mit einem hohen Anteil an Serinen, Aspartaten und Glutamaten. Eine C-terminale Domäne, für die die Interaktion mit P-TEFb diskutiert wird (Bisgrove et al., 2007), ist nur in Brd4 und BrdT konserviert, in Brd2 und Brd3 findet sie sich nicht (Wu und Chiang, 2007).

Abbildung 11: Domänenarchitektur von BET-Familie Proteinen. Die vier humanen BET-Familie-Proteine Brd2, Brd3, Brd4 und BrdT tragen zwei Bromodomänen (blau) sowie C-terminal davon eine ET-Domäne unbekannter Funktion (grau). Brd4 und BrdT besitzen zudem eine C-terminale Domäne (schwarz), über welche Brd4 mit P-TEFb interagieren kann, Brd2 und Brd3 fehlen diese Domäne. Die Funktionen der SEED-Domänen der BET-Familie-Proteine (grün) sowie zweier konservierter Regionen A und B nahe der zweiten Bromodomäne sind nicht geklärt. (Wu und Chiang, 2007)



Weitere Mitglieder der humanen BET-Familie sind die nukleäre Ser/Thr-Kinase Brd2, Brd3 und das Testis-spezifische BrdT. Alle BET-Proteine assoziieren mit hyperacetylierten Chromatinstrukturen (Wu und Chiang, 2007; LeRoy et al., 2008).

Eine strukturelle Charakterisierung der Bromodomänen von BET-Familie-Proteinen erfolgt bislang vor allem an Brd2, von dessen Bromodomänen BD1 und BD2 Kristall- bzw. NMR-Strukturen vorhanden sind, sowie kürzlich erschienene Kristallstrukturen der Komplexe von Brd2 BD1 mit drei acetylierten Histonpeptiden (Nakamura et al., 2007; Huang et al., 2007; Umehara et al., 2010). Im Laufe dieser Doktorarbeit wurde zudem eine NMR-Struktur der zweiten Bromodomäne BD2 von Brd4 veröffentlicht (Liu et al., 2008). Alle BD-Strukturen weisen die beschriebene Bromodomänenfaltung auf. Während Brd2 BD1 als Dimer im Kristall und in Lösung vorlag und so kooperativ an Acetyllysine auf Histonen binden könnte, wurden BD2 von Brd2 und Brd4 als Monomer beschrieben (Nakamura et al., 2007; Huang et al., 2007; Liu et al., 2008). Die Bindung der Bromodomänen an Histonpeptide zeigten schwache Affinitäten im mM-Bereich (Huang et al., 2007; Liu et al., 2008; Umehara et al., 2010). Detaillierte strukturelle Daten zu den BDs von Brd4 und ihrer Bindung von Histonsequenzen existierten zu Beginn dieser Doktorarbeit nicht.

2.7.1 Die Assoziation von Brd4 mit mitotischen Chromosomen

Das Bromodomänen-enthaltende Protein 4 (Brd4) wurde erstmals 2000 als ubiquitär exprimiertes Protein von knapp 200 kDa in Mauszelllinien näher beschrieben, welches bei Lokalisationsstudien während der Interphase im Nukleus nachgewiesen werden konnte (Dey et al., 2000). Beim Übergang der Zellen in die Mitose konnte Brd4 jedoch weiterhin mit den kondensierten Chromosomen assoziiert beobachtet werden, obwohl die meisten Chromatin-assoziierten Proteine wie Transkriptionsfaktoren während der Mitose dissoziieren (Martinez-Balbas et al., 1995). Aufgrund dieser Beobachtung wurde es zunächst MCAP (engl.: *mitotic chromosome-associated protein*; Dey et al., 2000), später jedoch wegen der Sequenzverwandtschaft zu anderen BET-Familie-Proteinen in Brd4 umbenannt (Houzelstein et al., 2002). Brd4-Knockout-Mäuse zeigten schwere Wachstumsstörungen, was auf eine essentielle Funktion von Brd4 innerhalb des Organismus hindeutet (Houzelstein et al., 2002). Eine genauere Untersuchung der Lokalisation von Brd4 an Chromosomen zeigte eine reversible Interaktion von Brd4 mit acetyliertem Chromatin, die über die Bromodomänen vermittelt wird. Da Brd2 ein ähnliches Verhalten zeigte, könnte diese flexible Assoziation ein Merkmal der BET-Familie darstellen (Dey et al., 2003). Die Assoziation von Brd4 an Chromatin erfolgt durch Bindung an acetylierte Lysine in Peptiden der Histone H3 und H4. Dabei wurden doppelt- oder vierfach-acetylierte Peptide bevorzugt, während einfach-acetylierte nur schwach banden. Unmodifizierte Peptide zeigten keine Interaktion mit Brd4 (Dey et al., 2003). Das Muster der gebundenen Acetylierung auf Histonen über die Mitose hinweg variiert zwischen unterschiedlichen BETs, scheint jedoch ein für BET-Familie Proteine spezifisches Phänomen zu sein, da andere Bromodomänen-enthaltende Proteine bei Eintritt in die Mitose dissoziieren. Damit könnten BET-Familie-Proteine und im speziellen Brd4 eine Möglichkeit der epigenetischen Vererbung des Acetylierungsmusters über die Zellteilung darstellen (Dey et al., 2003).

2.8.2 Funktionen von Brd4 in viralen Systemen

Auch eine Reihe von Viren wie das humane Papillomavirus (HPV) oder das Epstein-Barr Virus nutzen die essentielle Rolle von Brd4 in der Regulation der Transkription für ihre Zwecke und sichern durch Bindung von Brd4 an acetylierten Histonen H3/H4 den Erhalt ihrer viralen DNA an der Wirts-DNA über die Mitose hinaus (Schweiger et al., 2006; You et al., 2006; Ottinger et al., 2006; Lin et al., 2008). Das HPV-Protein E2 bindet ähnlich wie P-TEFb den C-Terminus von Brd4. Eine Kristallstruktur dieses Komplexes zeigte Brd4 CT als eine kurze α -Helix, welche quer über drei längere Helices von E2 bindet (Abbate et al., 2006). Das Kaposi's Sarcoma-assoziierte Herpesvirus (KSHV) interagiert jedoch nicht über den C-Terminus von Brd4, sondern über dessen ET-Domäne, der bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte. Für die Transkriptionsaktivierung von P-TEFb durch HIV-1 Tat/TAR ist Brd4 nicht notwendig, vielmehr würde aufgrund der Konkurrenz von Brd4 mit 7SK/Hxm1 und Tat mit 7SK/Hxm1 auch eine Konkurrenz von Brd4 und Tat/TAR naheliegen (Yang et al., 2005; Barboric et al., 2007). Dazu passend wurde eine Inhibition der Tat-abhängigen Transkriptionsaktivierung durch den C-Terminus von Brd4 beschrieben (Bisgrove et al., 2007; Urano et al., 2008).

2.8.3 Brd4 als Aktivator des P-TEFb-Komplexes

2005 wurde in zwei parallelen Studien eine Interaktion von Brd4 mit P-TEFb beschrieben, welche erste Einblicke in die Überführung des inhibierten P-TEFb-Komplexes zur aktiven Form lieferten (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Brd4 assoziiert ausschließlich mit aktivem P-TEFb und ist für die Rekrutierung zum Promotor und die Stimulation der Transkription durch vermehrte Ser2-Phosphorylierung verantwortlich (Abbildung 12 B; Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Die Rekrutierung zum Promotor erfolgt abhängig vom Acetylierungszustand der DNA (Jang et al., 2005). Zudem konnte eine verstärkte Rekrutierung von P-TEFb durch Brd4 während der Anaphase zum Ende der Mitose und damit vor anderen GTFs festgestellt werden. Dies fügt sich zu einem Modell zusammen, in welchem Brd4 epigenetisch einzelne Gene durch Bindung und Erhalt des Acetylierungsmuster markiert und schon während der Mitose für die Transkription vorbereitet, damit diese sofort bei Eintritt in die Interphase die nötige Transkriptionsmaschinerie rekrutiert und die Gene exprimiert werden können (Yang et al., 2008). Neben der Assoziation mit P-TEFb wird auch eine Interaktion zwischen Brd4 und dem Mediator-Komplex beschrieben (Jiang et al., 1998; Yang et al., 2005).

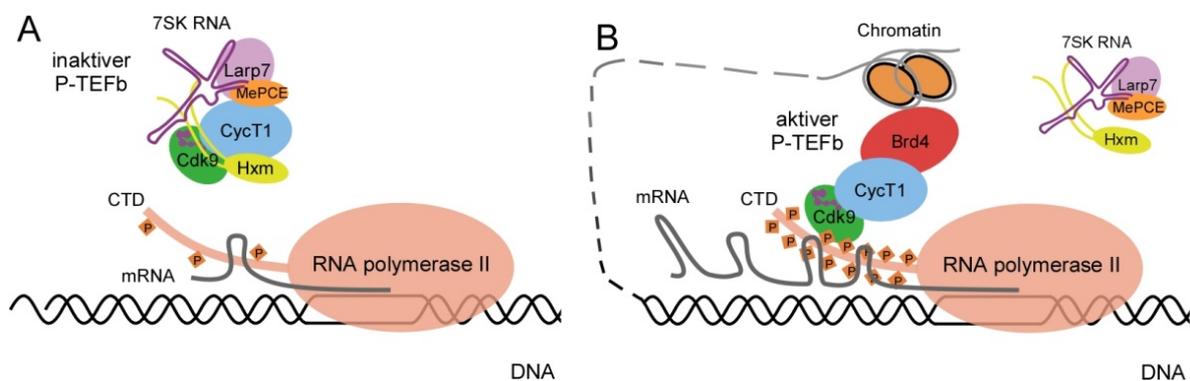


Abbildung 12: Aufhebung des inhibierten P-TEFb-Zustandes durch Brd4. A) Durch die Bindung des snRNP aus Hexim, 7SK, Larp7 wird die Kinaseaktivität von P-TEFb unterdrückt. Auch das Capping-Enzym MePCE ist hier als Teil des 7SK snRNPs dargestellt, obwohl eine dauerhafte Assoziation mit dem Komplex umstritten ist. Durch die Bindung des Aktivators Brd4 wird der snRNP von P-TEFb verdrängt und die Kinaseaktivität, die auf die CTD der Pol II wirkt, wiederhergestellt. Gleichzeitig rekrutiert Brd4 den Komplex zum Ort der Transkription und gewährleistet somit sowohl die katalytische als auch die örtliche Funktionalität von P-TEFb.

Die Studien von 2005 beschrieben eine Bindung von Brd4 an P-TEFb, vermittelt durch die Bromodomänen von Brd4. Dabei wird eine exklusive Interaktion mit einem C-terminalen Bereich von CycT1 (426-516) beschrieben (Jang et al., 2005). In der Studie des Zhou-Laboratoriums konnte eine Abhängigkeit der Bindung von Brd4 an Cdk9 von Ser175 gezeigt werden, die die Kinaseaktivität nicht beeinträchtigt, wohl aber bei der Bindung von 7SK/Hxm1 eine wichtige Rolle spielt (Cheng et al., 2004; Yang et al., 2005). Dies legt eine Konkurrenz von Brd4 und 7SK/Hxm1 um P-TEFb nahe (Abbildung 12). Passend dazu fördern Stress-induzierende Faktoren wie DRB oder UV Bestrahlung eine Lösung von 7SK/Hxm1 von P-TEFb und verschieben das Gleichgewicht zugunsten der Brd4-gebundenen Form. Der Phosphorylierungszustand von Thr186 ist nicht entscheidend für die Interaktion mit Brd4 (Yang et al. 2005).

Der Interaktion von Brd4 mit P-TEFb durch seine Bromodomänen widersprachen Experimente von Bisgrove et al., die diese auf fehlerhafte Deletionsstudien zurückführten und stattdessen die Bindung von Brd4 an P-TEFb über ein kurzes C-terminales Fragment beschrieben, welches sowohl mit CycT1 als auch mit Cdk9 interagiert und für die Transkriptionaktivierung ausreichend ist (Bisgrove et al., 2007). Ein detaillierter, molekularer Mechanismus für die Wirkung von Brd4 auf P-TEFb ist bislang nicht bekannt.

2.8.4 Zielsetzung

Die Regulation des Transkriptionsfaktors P-TEFb stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus der Transkriptionselongation dar. Der P-TEFb Komplex wird durch die Wirkung des Bromodomänen-enthaltenden Protein Brd4 aus dem inaktiven in den aktivierten Zustand überführt. Dabei interagiert Brd4 einerseits direkt mit P-TEFb, andererseits vermittelt es durch die Interaktion mit acetylierten Histonegmenten die Rekrutierung des Komplexes an Chromatinstrukturen. Die genaue Funktion von Brd4 in der Aktivierung von P-TEFb blieb bislang unklar, da die bisherigen zellbiologischen Studien an Brd4 sich auf die Co-Lokalisation und physische Interaktion mit P-TEFb beschränkten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden, welchen Einfluss unterschiedliche Domänen von Brd4 auf die Inhibition von P-TEFb nehmen und ob diese einem ähnlichen Aktivierungsmechanismus folgen wie das virale HIV-1 Tat-Protein. Durch die Verwendung isolierter Proteindomänen aus rekombinanten Expressionen in einem Kinase-Aktivitätsassay sollte eine eindeutige Identifizierung und Charakterisierung der aktivierenden Domäne von Brd4 ermöglicht werden. Gleichzeitig sollten die Bromodomänen von Brd4 für strukturelle Studien eingesetzt werden, um Einblicke in die Interaktion mit acetylierten Histonen zu erhalten. Dabei könnte ebenfalls die Assoziation mit anderen Modifikationen im Histonkontext wie Citrullin oder kurzgekettigen Acylmodifikationen von Lysin analysiert werden, für die bislang keine Interaktionsdomänen identifiziert wurden. Diese Studien sollten das bestehende Bild der Rekrutierung von P-TEFb zur Transkriptionsmaschinerie ergänzen und möglicherweise erweitern.

Eine zusätzliche Regulation des P-TEFb Komplexes wird durch die Bildung eines inhibierten Komplexes erreicht, in welchem P-TEFb mit dem Protein Hexim1 und der 7SK snRNA interagiert und durch Hexim1 inhibiert wird. 7SK RNA fungiert dabei als Gerüst dieses inaktiven Komplexes und wird ihrerseits von dem RNA-bindenden Protein Larp7 stabilisiert. Larp7 wurde bislang nur unzureichend charakterisiert und sollte in der vorliegenden Arbeit biochemisch untersucht werden. Dabei sollten sowohl erste Einblicke in die strukturelle Organisation von Larp7 gewonnen werden, als auch die Interaktion mit der 7SK snRNA näher betrachtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

3.1.1 Feinchemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chemikalien der folgenden Hersteller verwendet: AppliChem (Darmstadt), FMC Bioproducts (Vallensbaek Strand, Dänemark), Gerbu (Gaiberg), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (München)

3.1.2 Nukleotide:

ATP, Feststoff	Roth, Karlsruhe
[γ - ³² P]-ATP, 5 μ Ci/ μ l, 3000 mCi/mmol	Perkin Elmer, Boston, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Dialysemembranen	Roth, Karlsruhe
Kristallisationsscreens	Qiagen, Hilden
Kristallisationsplatten 96fach	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Corning Life Sciences, Lowell, USA
Kristallisationsplatten Linbro 24fach	MP Biomedicals, Solon, USA
Amicon Ultrafiltrationseinheiten	Millipore Amicon, Witten
Vivacell250 Ultrafiltrationseinheiten	Sartorius stedim, Aubagne, France
Whatman P81 Zellulosepapier	Omnilab, Bremen

3.1.4 Molekularbiologische Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Ambion MEGAscript T7 Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.1.5 Chromatographiematerialien

Säulenmaterial

GSH 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden
Kationenaustauscher POROS 20 HS	Applied Biosystems, Foster City, USA

Säulen

HiLoad Superdex 75 16/60 prep grade	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade	GE Healthcare, Freiburg
Superdex 75 10/30	GE Healthcare, Freiburg
Superdex 200 10/30	GE Healthcare, Freiburg
VYDAC-C ₄ -Säule für ESI-MS	Grace, Deerfield, USA

3.1.6 Größenstandards

Gelchromatographiestandard	Biorad, München
LMW-Marker für SDS-PAGE	GE Healthcare, Freiburg
DNA-Größenstandard 1kb	Invitrogen, Karlsruhe

3.2 Mikroorganismen und Zellstämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>
TG1	<i>E. coli</i> F' traD36 lac ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /supE Δ(hsdM-mcrB)5 (r _k ⁻ m _k ⁺ McrB ⁻) thi Δ(lac-proAB)
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F' dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ(DE3)
BL21(DE3) R3/Rosetta	<i>E. coli</i> B dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ(DE3) pRARE
<i>Sf21</i>	Zelllinie aus dem Eierstockgewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Vaughn et al., 1977)

3.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Taq Expand High Fidelity	Roche, Mannheim
DNA Polymerase	Roche, Mannheim
T7 Polymerase	gruppeninterne Herstellung
TEV Protease	gruppeninterne Herstellung
PreScission Protease	gruppeninterne Herstellung

3.4 Synthetische Peptide

Die folgenden Peptide wurden von der Firma Biosynthan, Berlin synthetisiert und für biochemische und kristallographische Analysen typischerweise in 100 µl ddH₂O aufgenommen.

<u>Peptid</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Masse</u>
H3-K14(ac)	GG-K(ac)-APRKQ-Amid	(882,8 Da)
H4-K5(ac)	RG-K(ac)-GGKGL-Amid	(811,8 Da)
H4-K16(ac)	GA-K(ac)-RHRKV-Amid	(993,5 Da)
H3-K14(cit)	GG-Cit-APRKQ-Amid	(870,3 Da)
H4-R3(cit)	SG-Cit-GKGGK-Amid	(747,9 Da)
CycT1-K390(ac)	SL-K(ac)-EYRAK-Amid	(1035,9 Da)
CycT1-K390(ac)	AQ-K(ac)-RQLEN-Amid	(1027,7 Da)
Brd4 (33-38)	AQPQPA- Amid	(611,6 Da)
H3-K14(prop)	GG-K(prop)-APRKQ-Amid	(897,9 Da)
H3-K23(prop)	AT-K(prop)-AARKS-Amid	(888,8 Da)
H3-K14(but)	GG-K(butyr)-APRKQ-Amid	(911,7 Da)
H3-K14(val)	GG-K(val)-APRKQ-Amid	(924,7 Da)
H4-K5K8(ac)	GRG-K(ac)-GG-K(ac)-GLGKG-Amid	(1155,9 Da)

3.5 Nukleinsäuren

Oligonukleotide

Die zur Herstellung der Plasmide und RNAs verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, München, synthetisiert und auf 10 pmol/μl in ddH₂O gelöst.

Vektoren

pProEx-Htb , TEV-site modifiziert	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX-4T1, TEV-site modifiziert	GE Healthcare, Freiburg
pOPIN	University of Oxford, UK

3.6 Geräte

Agarosegelkammer, DNA-SUB-Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank, Heraeus CO ₂ Auto zero	Heraeus Instruments, Hanau
CD-Spektrometer J-815	Jasco, Gross-Umstadt
Elektroporationsgerät, Gene Pulser	Bio-Rad, München
Elektrospraymassenspektrometer	
Finnigan LCQ Advantage MAX	Thermo Fisher Scientific, Corston, UK
Agilent 1100 Chromatographiesystem	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
FPLC-System Äkta Prime	GE Healthcare, Freiburg
HPLC-Systeme:	
Waters 600 S Controller,	Milford, USA
Waters 626 Pumpe, Waters 2487 Dual	Milford, USA
Absorptionsdetektor, Waters 717plus	Milford, USA
Autosampler und Inline Entgaser AF	Milford, USA
Kristallisationsroboter Mosquito Crystal	TTP Labtech, Royston, UK
Mikrofluidizer, Modell 100S	Microfluidics Corp., Newton, USA
Microkalorimeter, VP-ITC	GE Healthcare, Freiburg
Microkalorimeter, iTC200	GE Healthcare, Freiburg
Nanodrop DN-1000 UV-Spektrometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
PCR Express-Gerät	Hybaid, Franklin, USA
Röntgengenerator, Detektor	Marresearch, Norderstedt
Schüttelinkubator Multitron	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
SDS Gel system, Mini protean III- Electrophoresis System	Bio-Rad, München
Szintillationszähler	Beckmann Coulter, Brea, USA
Ultraschallgerät, Branson Sonifier W-250	Branson, Danbury, USA
Visualisierungs- und Inkubationseinheit	
Rock Imager	Formulatrix, Waltham, USA
Zentrifuge Avanti TM J-20 XP	Beckmann, Fullerton, USA
Zentrifuge JS-HS centrifuge	Beckmann, Fullerton, USA

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*)

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte wurden auf Grundlage der vollständigen Gene oder bereits vorhandener Plasmide eines Proteins mittels Polymerasekettenreaktion erstellt. In einem dreiteiligen Zyklus wird dabei eine DNA-Matrize bei hohen Temperaturen in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung), um dann nach der Anlagerung von komplementären Oligonukleotiden (Hybridisierung) bei moderateren Temperaturen mit Hilfe der DNA-Polymerase mit freien Nukleotiden zu Doppelsträngen ergänzt zu werden (Elongation). Die Grenzen des entstehenden Konstrukts werden durch die Wahl der Oligonukleotide bestimmt. In den weiteren Syntheseyklen dienen neu synthetisierte Stränge ihrerseits als Matrize. Rückstände der Reaktion können im Anschluss durch eine Agarosegelelektrophorese entfernt werden.

Bestandteil	Volumen	Schritt	Temperatur	Zeit	
200 ng/µl DNA-Matrize	1 µl	Denaturierung	95°C	120 s	
2,5 mM dNTPs	4 µl	15-25 x			
10 pmol/µl 3'Primer	1 µl	Denaturierung	95°C	15 s	15
10 pmol/µl 5'Primer	1 µl	Hybridisierung	T _m	30 s	-
5000 U/ml Polymerase	0,5 µl	Elongation	72°C	45-60 s	25x
10x Polymerasepuffer	5 µl				
ddH ₂ O	37,5 µl	Finale Elongation	72°C	420 s	

mit T_m: 4°C x (Anzahl G + C) + 2°C x (Anzahl A + T) – 5°C

In einer Variation der herkömmlichen PCR-Reaktion kann durch eine überlappende PCR sowohl die Einführung von Punktmutationen als auch die Neusynthese eines DNA-Fragmentes ohne vorliegende Matrize erfolgen. Punktmutationen in bereits bestehende Konstrukte wurden in einer ersten PCR durch Synthese zweier überlappender DNA-Fragmente eingeführt, welche jeweils die gewünschte Mutation am überlappenden 5' bzw 3' Ende aufwiesen. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden diese beiden Fragmente anstatt des ursprünglichen DNA-Konstrukts eingesetzt und im Hybridisierungsschritt zur Matrize des gewünschten, mutierten Fragments verwendet.

Zur Synthese kurzer DNA-Fragmente ohne vorliegende DNA-Matrize wurden ebenfalls überlappende Oligonukleotide eingesetzt, welche abwechselnd das gesamte gewünschte Konstrukt überspannen. Die jeweiligen einzelsträngigen Überhänge wurden von der DNA-Polymerase zum DNA-Doppelstrang aufgefüllt. Die so erfolgte Synthese der Brd4 CT-Konstrukte wurde von Frau Karin Vogel-Bachmayr durchgeführt.

3.7.2 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Reinigung eines DNA-Fragmentes wurde die DNA mit 6x Probenpuffer versetzt und in einem 0,8-1,2%-iges Agarosegel einer Spannung von 120 V ausgesetzt. Nach der Trennung der Bestandteile der Probe in Abhängigkeit ihrer Größe ermöglichte der Farbstoff Ethidium-

bromid eine Visualisierung der DNA im Gel durch UV-Licht-Bestrahlung. DNA-Banden konnte aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Extraction Kit (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert werden.

<u>10x TBE-Puffer</u>	<u>6 x Probenpuffer</u>
89 mM Tris	10% Ficoll
89 mM Borsäure	0,025% Bromphenolblau
0,9 mM EDTA	0,025% Xylencyanol
0,006% EtBr	

3.7.3 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme gehören zu den Endonukleasen, die ein spezifisches, palindromisches DNA-Doppelstrangmotiv binden und an definierter Stelle spalten. Zur Einführung zweier unterschiedlicher 3'- und 5'-Restriktionsschnittstellen wurden entsprechende Oligonukleotide in einer PCR verwendet. Nach der PCR wurden die entstandenen Fragmente in einem präparativen Ansatz sequenzspezifisch durch die gewählten Restriktionsenzyme verkürzt. Reaktionsrückstände wurden durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Extraktion (3.7.2) entfernt. Der Restriktionsverdau wurde auch zur Verifizierung der Klonierung eines Fragmentes durch Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und anschließendem Nachweis des klonierten Fragmentes in einem Agarosegel verwendet.

<u>Bestandteil</u>	<u>Präparativer Ansatz</u> Konzentration	<u>Analytischer Ansatz</u> Konzentration
DNA	Gesamtansatz der PCR	100 ng
5' Restriktionsenzym	15-20 U	15-20 U
3' Restriktionsenzym	15-20 U	15-20 U
Puffer	1x	1x
ddH ₂ O	Ad 40 µl	Ad 10 µl

3.7.4 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor

Nach der Herstellung eines PCR-Fragmentes wurde dieses in einem Ligationsansatz mit dem gewünschten Vektor zu einem Plasmid ligiert. Beide Bestandteile waren zuvor mit denselben Restriktionsenzymen verdaut worden, so dass die T4-Ligase die überstehenden 3'- und 5'-Enden der Fragmente verbinden konnte. Die Ligation erfolgte bei RT für 1 bis 5 h.

<u>Bestandteil</u>	<u>Volumen</u>
geschnittenes PCR-Fragment	8 µl
geschnittener Vektor	1 µl
10x Ligationspuffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl
ddH ₂ O	8 µl

3.7.5 Transformation und Anzucht von *E. coli*-Zellen

Sowohl die Amplifikation eines neu-klonierten Plasmids in TG1-Zellen (3.7.6) als auch die Überexpression eines Plasmids in BL21(DE3)-Zellen (3.7.9) erforderte die Transformation des entsprechenden Plasmids durch Hitzeschock- oder Elektroschocktransformation in *E. coli*-Zellen. Eine Anzucht der transformierten Zellen erfolgte stets in LB-Medium oder auf LB-Platten. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden von Frau Diana Ludwig hergestellt.

Hitzeschocktransformation

10 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl eines Miniprep-Plasmids wurden mit etwa 150 µl *E. coli*-Suspension vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch spontane Überführung des Ansatzes in einem auf 42°C vorgewärmten Heizblock für 45 s. Danach wurde der Ansatz erneut auf Eis gelagert und auf eine LB-Platte mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert. Die Anzucht transformierter Zellen erfolgte über Nacht bei 37°C.

Elektroschocktransformation

10 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl eines fertigen Miniprep-Plasmids wurden mit etwa 150 µl *E. coli*-Suspension vermengt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung in eine Elektroporationsküvette wurden die Zellen einer Spannung von 1,5 V ausgesetzt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Mediums wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Das zugegebene Medium wurde nach kurzer Zentrifugation abgenommen, die Zellen auf eine LB-Platte mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kolonien wurden am nächsten Tag von der Platte in eine Flüssigkultur in LB- oder TB-Medium überführt, dem das Selektionsantibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben wurde. Für eine Plasmidpräparation wurden 5 ml-Kulturen, für Überexpressionen 100 ml-Flüssigkultur angesetzt, welche bis zur gewünschten optischen Dichte (OD) bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert wurden. Die OD einer Bakterienkultur wurde mit Hilfe eines Photometers (Fa. Eppendorf) gegen LB-Medium bestimmt.

<u>LB-Medium</u>	<u>TB-Medium</u>	<u>nach Autoklavieren zugeben:</u>
10 g/l Bactotrypton	12 g/l Trypton	100 ml von:
5 g/l Hefeextrakt	24 g/l Hefeextrakt	0,17 M KH ₂ PO ₄
10 g/l NaCl	4 ml/l Glycerin	0,72 M K ₂ HPO ₄
5 mM NaOH		

3.7.6 Plasmidpräparation aus *E. coli*-Zellen

Nach erfolgreicher Plasmidligation und Transformation in *E. coli* TG1-Zellen können diese zur Amplifikation des Plasmids verwendet werden. Die Isolierung des amplifizierten Plasmids erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Plasmid Kits (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben.

3.7.7 Sequenzierung eines DNA-Fragmentes

Die Identität und korrekte Aminosäuresequenz aller in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurde durch Sequenzierung des DNA-Fragmentes sichergestellt. Hierfür wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) verwendet. In einem PCR-Ansatz wurden Sequenzierungspuffer mit der zu untersuchenden DNA, entsprechenden Oligonukleotiden sowie Terminator Reaction Mix eingesetzt. Nach der PCR Reaktion wurde die DNA gefällt und kapillarelektrophoretisch getrennt (MPI Dortmund, Einheit für Biotechnologie).

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Sequenzierungsansatz	Volumen	Schritt	Temperatur	Zeit
ddH ₂ O	10 µl	Strangtrennung	96°C	10 s
Terminator Reaction Mix	4 µl	Hybridisierung	52°C	25 x 5 s
10x Sequenzierungspuffer	2 µl	Elongation	60°C	240 s
soliierte DNA	3 µl			
5' bzw. 3' Oligonukleotide	1 µl			

3.7.8 Herstellung einer *E. coli*-Glycerinkultur

1200 µl einer *E. coli*-Kultur mit einer OD von 0,6-1,0 wurden mit 800 µl 50% Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Glycerinkultur konnte bei -80°C dauerhaft gelagert und zur Inokulierung einer Expressionskultur verwendet werden.

3.7.9 Proteinüberexpression in *E. coli*-Zellen

Für die Überexpression eines rekombinanten Proteins in *E. coli*-Zellen wurden 100 ml Vorkultur zur Inokulierung einer 5 l-Expressionskultur mit einer OD von 0,05 verwendet, welche bei 37°C mit 150-180 rpm in einem Schüttelinkubator (Fa. Brunswick) bis zu einer OD von 0,3-0,5 angezogen wurde. Die Kultur wurde auf Expressionstemperatur gebracht und die Expression bei einer OD von 0,6-1,0 mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g pelletiert, und entweder direkt für eine Proteinreinigung verwendet (3.8.1-3.8.8), oder mit PBS-Puffer (130 mM NaCl, 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4) gewaschen und pelletiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die in dieser Arbeit gereinigten Proteine wurden entweder für 4 h bei 30°C oder für 18 h bei 20°C in LB- oder TB-Medium exprimiert. TB-Medium konnte auch als Autoinduktionsmedium vor der Expression mit 0,2% sterile Laktose versetzt und bei 37°C inkubiert werden. Nach 4 h wurde die Expressionstemperatur von 25°C eingestellt und die Kultur am nächsten Morgen geerntet.

Für die Expression von rekombinanten Proteinen wurde zunächst der *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) verwendet, nach einer Kontamination mit Bakteriophagen wurde der phagenresistente Stamm BL21(DE3) R3/Rosetta eingesetzt, welcher vom Structural Genomic Consortium, Oxford, zur Verfügung gestellt wurde (www.sgc.ox.ac.uk).

3.7.10 Expression von Proteinen in Insektenzellen

Die Expression von P-TEFb (Cdk9 (1-340) und CycT1 (1-272) mit C-terminalem Hexahistidinaffinitätsanker an CycT1) erfolgte in Baculovirus-infizierten Sf21-Zellen im pFastBac-Dual-Vektor-System (Fa. Invitrogen; Czudnochowski, 2009). Die Expression wurde

von Frau Janna Bigalke und Frau Diana Ludwig angesetzt und überwacht. Die Zellen wurden im Anschluss für 20 min bei 2500 x g zentrifugiert und nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer durch erneute Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden schockgefroren bei -80°C gelagert.

3.7.11 *In vitro* Synthese von RNAs

Die in dieser Arbeit verwendeten RNAs wurden auf der Grundlage eines linearisierten 7SK-Plasmids (Vollängen 7SK snRNA) oder der entsprechenden Oligonukleotide (39 nt 7SK) unter Verwendung des Ambion MEGAscript T7-Kits (Fa. Applied Biosystems) von Frau Karin Vogel-Bachmayr transkribiert und gereinigt.

3.8 Biochemische Methoden

3.8.1 Aufschluss einer Expressionskultur

Erster Schritt der Isolierung eines Proteins aus einer entsprechenden Expressionskultur ist die Zerstörung der Zellstrukturen zur Freisetzung der exprimierten Proteine durch einen Zellaufschluss. Im Falle von *E. coli*-Kulturen erfolgt dies durch einen Microfluidizer (Fa. Microfluidics Corp), mit dem die Zellen bei 4°C 3 bis 4mal bei einem Druck von 800 bar durch eine Kapillare gepresst wurden, bis ein homogenes Zelllysate vorlag.

Insektenzellen wurden mittels Ultraschall durch 3 Zyklen mit je 15 Impulsen (*Output control* = 4 und *Duty cycle* = 80) unter Verwendung eines Sonifier auf Eis Ultraschallgerät (Fa. Branson) aufgeschlossen.

Nach dem Aufschluss wurde das gewonnene Zelllysate in beiden Fällen durch Zentrifugation bei 30.000 x g und Filtration (Porengröße 0,2 µm) von unlöslichen Zellbestandteilen geklärt und der Überstand zur Proteinreinigung verwendet.

3.8.2 Affinitätschromatographie

Nach dem Zellaufschluss (3.8.1) wurden rekombinante Proteine meist über einen mit dem Protein exprimierten Affinitätsankers durch affinitätschromatographische Reinigung isoliert. Plasmide auf Basis des pProEx-Vektors codierten für einen N-terminalen Hexahistidinanker, während Proteine des pGEX-Vektors einen N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST)-Anker trugen. Die zwischen Anker und Protein platzierte Protease-Schnittstelle ermöglichte eine Abtrennung des Affinitätsankers. Die affinitätschromatographischen Reinigungen von Proteinen erfolgten mittels eines ÄktaPrime-FPLC-System (Fa. GE Healthcare), welches die Absorption eluierender Fraktionen bei 280 nm detektierte. Die Flussrate betrug 1,0-3,0 ml/min.

Reinigung von Polyhistidininfusionsproteinen über Nickel-NTA-Säulen

Die Isolierung eines Proteins mit einem Hexahistidinaffinitätsanker durch eine Nickel-NTA-Säule (Fa. Qiagen) beruht auf der Chelatierung des Nickel-Ions mit Histidinen des Fusionsproteins. Die Histidine des Affinitätsankers können durch Zugabe von Imidazol von der Säulenmatrix verdrängt und das Fusionsprotein eluiert werden. Hierfür wurde die Säule

nach Äquibrierung mit dem Zelllysats beladen und mit Waschpuffer geklärt. Zur Verdrängung unspezifisch gebundener Proteine wurde dem Waschpuffer 20-30 mM Imidazol sowie 500 mM NaCl zugesetzt. Die Elution erfolgte durch einen Imidazolgradienten von 30-500 mM. Eine Analyse der gesammelten Elutionsfraktionen auf ihre Proteinbestandteile erfolgte durch SDS-PAGE (3.8.8), wobei Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, vereint wurden. Die Entfernung des Affinitätsankers vom gewünschten Protein erfolgte durch einen proteolytischen Verdau mit TEV (engl: *tobacco etch virus*) oder PreScission-Protease (3.8.4).

Die Reinigung über einen Hexahistidinanker wurde u.a. zur Isolierung der Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4 eingesetzt. Dabei wurden fünf BD1-Konstrukte mit den Grenzen 27-168, 42-168, 46-168, 51-168 und 54-168 gereinigt, sowie zwei BD2-Konstrukte (346-464) und (349-464). Nach Abtrennen des Affinitätsankers wurde eine 95%-ige Reinheit der Proteine durch Gelfiltration erreicht. BD1 wurde in den Puffer 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP und BD2 in den Puffer 50 mM HEPES, pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP gereinigt und auf 20-90 mg/ml konzentriert. Bei hohen Konzentrationen über 60 mg/ml wurden die Proben direkt für ITC-Experimente verwendet, da sie durch Schockgefrieren präzipitieren.

Das in Baculovirus-infizierten Sf21-Zellen exprimierte P-TEFb aus Cdk9 (1-340) und CycT1 (1-271)-His wurde nach dem Aufschluss per Ultraschall auf eine Ni-NTA-Säule geladen und über einen 200 ml-Gradienten von 20-500 mM Imidazol eluiert. Nach einer 1:2-Verdünnung in einen Puffer ohne Imidazol wurden die proteinenthaltenden Fraktionen eingengt (siehe auch 3.8.3) und über Gelfiltration mit einer S200-Säule gereinigt. Zur Stabilisierung des leicht präzipitierenden Proteins wurde als Puffer 50 mM HEPES, pH 7,6, 500 mM NaCl, 10% Glycerin und 5 mM β -ME gewählt. Pro Reinigung konnten etwa 400 μ g des Komplexes aus 3 l Expressionskultur gewonnen werden.

Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Reinigung eines GST-Fusionsproteins wurde eine Glutathionmatrix (GSH-Säule, Fa Qiagen) verwendet. Das aufgeschlossene Zelllysats wurde auf die GSH-Säule geladen und mit Waschpuffer sowie einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl) gespült. Nach erneutem Klären mit Waschpuffer wurde gebundenes Protein mit 10 mM GSH-Puffer eluiert. Die Überprüfung der Reinheit der eluierten Proben erfolgte durch SDS-PAGE (3.8.8).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Reinigung über einen GST-Affinitätsanker zur Gewinnung von CycT1 (1-281) sowie der Brd4 CT-Konstrukte und deren Mutanten eingesetzt. Nach der Elution von einer GSH-Säule wurden die Proteine durch proteolytischen Verdau mit TEV-Protease vom Affinitätsanker getrennt und mittels Gelfiltration gereinigt. Bei der Reinigung von GST-CTD-Konstrukten wurde der Affinitätsanker nicht entfernt, und die Konstrukte wurden nach der GSH-Elution in konzentrierter Form direkt über eine Gelfiltration gereinigt.

3.8.3 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Verringerung des Volumens einer Proteinlösung oder der Erhöhung der Konzentration vor der Verwendung oder Lagerung eines Proteins wurde durch Zentrifugation in Amicon

Ultrafiltrationseinheiten (Fa. Millipore) oder durch Verwendung von Luftdruck in Vivacell250 Ultrafiltrationseinheiten (Fa. Sartorius stedim) erreicht. Zur Lagerung wurden Proteine schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.8.4 Entfernung des Affinitätsankers durch proteolytischen Verdau

Die Entfernung der Hexahistidin- und GST-Affinitätsanker erfolgte durch proteolytischen Verdau mit der TEV- oder der PreScission-Protease, welche die Peptidbindung eines Proteins an spezifischen Aminosäuresequenzen schneiden. Die Proteinlösung wurde mit der entsprechenden Protease im Verhältnis 1:80 (TEV:Protein) oder 1:20 (PreScission:Protein) versetzt und über Nacht bei 4°C in einem für die Proteaseaktivität geeigneten Puffer inkubiert. Affinitätsanker und Protein wurden durch erneuten Auftrag auf die Affinitätssäule oder durch Gelfiltration getrennt (3.8.5). Ebenso konnte der Verdau auf der Affinitätssäule durchgeführt werden. Hierfür wurde der Puffer nach den Waschschritten mit 2-4 mg der Protease versetzt und in einem Kreislauf bei niedriger Flussrate über die Säule geleitet.

3.8.5 Größenausschlusschromatographie / Gelfiltration

Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration ist eine der molekularbiologischen Standardmethoden zur Trennung von Bestandteilen einer Proteinlösung. Dabei wird eine Säulenmatrix verwendet, deren Poren durch ihre definierte Größe eine längere Retention kleinerer Bestandteile bewirken, während größere Bestandteile nicht oder nur kürzer in die Poren diffundieren können. In der vorliegenden Arbeit wurden Superdex-Säulen der Firma GE Healthcare eingesetzt. Neben diesen präparativen Anwendungen kann die Gelfiltration auch zur Analyse der Homogenität, Reinheit und des Oligomerisierungsgrades einer Probe sowie einer möglichen Komplexierung eingesetzt werden.

Präparative Gelfiltration

Alle in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine wurden neben der Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie (3.8.2, 3.8.6) durch einen präparativen Gelfiltrationslauf von Verunreinigungen getrennt und umgepuffert. Hierfür wurden die Proteine über eine S75 oder S200 16/60-Gelfiltrationssäule (Fa. GE Healthcare) bei 0,2-1,0 ml/min unter Verwendung eines ÄktaPrime FPLC-Systems (Fa. GE Healthcare) über die Säule geleitet. Die gesammelten Fraktionen wurden während der Elution durch Aufnahme der Absorption bei 280 nm und anschließend per SDS-PAGE (3.8.8) analysiert und Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, vereint. Nach der Konzentrierung wurden die Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Analytische Gelfiltration

Zur Untersuchung der Homogenität sowie der Abschätzung des Oligomerisierungsgrades einer Probe wurde die Retentionszeit eines Proteins auf einer analytischen S75 oder S200 10/30 Superdexsäule (Fa. GE Healthcare) unter Verwendung eines HPLC-Systems (Fa. Waters) ermittelt. Bei einer Flussrate von 0,5-1,0 ml/min wurden 100 μg der Proteinprobe aufgetragen und die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Proben des Eluats wurden gesammelt und auf ihren Proteingehalt per SDS-PAGE analysiert. Die Interaktion von Larp7-

Konstrukten mit 7SK snRNA wurde durch Analyse der Retentionszeiten der einzelnen Komponenten im Vergleich zur Retentionszeit eines potentiellen Komplexes untersucht. Der verwendete Puffer enthielt zur Stabilisierung der RNA 50 mM HEPES, pH 7,0, 350 mM NaCl, 10% Glycerin und 5 mM β -ME. Während Messungen der Bromodomänen von Brd4 (4.2.1) bei Raumtemperatur verliefen, wurden die Messungen der Protein-RNA-Komplexe bei 4°C durchgeführt.

3.8.6 Ionenaustauschchromatographie

Zur Reinigung Proteins Larp7 wurde Ionenaustauschchromatographie eingesetzt, deren Grundlage die Bindung eines geladenen Moleküls an eine mit gegensätzlich geladenen Gruppen gebundene Säulematrix ist. Eingesetzt wurde ein POROS HS Kationenaustauscher (Fa. Applied Biosystems), dessen Säulenmatrix mit negativ geladenen Sulfopropyl-Gruppen gekoppelt ist. Aufgrund positiver Ladungsbereiche können Larp7-Konstrukte effizient an die Säulenmatrix binden, während negativ geladene Nukleinsäuren durch die Sulfopropyl-Gruppen verdrängt werden.

Die Kationenaustauschchromatographie wurde sowohl zur initialen Isolierung von Larp7-Konstrukten aus dem Zelllysat, als auch zur Trennung des Proteins von abgeschnittenem Affinitätsanker eingesetzt. Die Lösung wurde mit 10 ml/min auf die Säulen aufgetragen und mit einem Nidrigsalzpuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM β -ME) gewaschen. Durch einen 300 ml-Gradienten von 25 mM auf 1 M NaCl konnten zunächst lockerer gebundene Proteine bzw. Protein/Nukleinsäurekomplexe von der Sulfopropyl-Matrix gelöst werden, während nukleinsäurefreies Protein sich erst zum Ende des Gradienten von der Säule löste. Durch Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm wurden Protein/Nukleinsäure-enthaltende Fraktionen identifiziert und per SDS-PAGE auf ihre Zusammensetzung untersucht (3.8.8). Nach dem proteolytischen Verdau mit PreScission-Protease konnte der getrennte Affinitätsanker His-MBP durch eine erneute Kationenaustauschchromatographie vom Larp7-Konstrukt getrennt werden. Durch eine Gelfiltration wurden der Hochsalzpuffer sowie übergebliebene Verunreinigungen entfernt (3.8.5).

3.8.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Konzentration einer Proteinlösung erfolgte in dieser Arbeit entweder photometrisch nach Bradford (Bradford, 1976), oder durch die Bestimmung der UV-Absorption bei 280 nm mit Hilfe eines Nanodrop-Spektrometer (Fa. Thermo Scientific).

Konzentrationsbestimmung nach Bradford

800 μ l ddH₂O wurden mit 200 μ l Bradford-Reagenz (Fa. Roth, Karlsruhe) und 1 μ l der Proteinlösung vermengt und deren Absorption bei 595 nm im Vergleich zu einem Ansatz ohne zugesetztes Protein bestimmt. Eine zuvor erstellte Eichgerade eines Proteins bekannter Konzentration ermöglicht die Korrelation der Absorption der untersuchten Proteinprobe zu seiner Konzentration.

Konzentrationsbestimmung über die Absorption bei 280 nm

Mit Hilfe eines Nanodrop DN-1000 UV-Spektrometers (Fa. Thermo Scientific) wurde die Absorption einer entsprechenden Proteinlösung bei 280 nm bestimmt und zur Berechnung der Konzentration der Probe auf Grundlage von Extinktionskoeffizienten und Masse eingesetzt. Neben der Absorption bei 280 nm wird vom Spektrometer auch die Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm aufgenommen. Anhand des Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} können Nukleinsäureverunreinigungen der Probe detektiert werden. Eine reine Proteinprobe entspricht dabei einem Quotienten von 0,57, während eine reine RNA-Probe einen Quotienten von 2 entspricht (Cold Spring Harb. Protoc.; 2006).

3.8.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Zusammensetzung einer Proteinlösung wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) eingesetzt, um die Proteine einer Probe aufzutrennen. Dabei wurde ein Tris-Glycin-gepuffertes System verwendet, in welchem durch SDS (Natriumdodecylsulfat, engl.: *sodium dodecylsulfat*) und β -Mercaptoethanol eine Entfaltung der Proteine erreichen. Die verwendeten Gele wurden in einem Bio-Rad Mini-Protean III-System aus einem 15-20%igem Trenngel und einem 6%igen Sammelgel gegossen und nach Polymerisation des Acrylamids in SDS-Laufpuffer mit den Proteinproben beladen. Proben wurden vor dem Auftrag durch SDS-Probenpuffer und Erhitzung auf 95°C denaturiert. Nach dem Auftrag der denaturierten Proteine auf das Gel bewirkte eine angelegte Spannung von 200 V oder 40 mA eine Bewegung der durch SDS-Bindung proportional zu ihrem Molekulargewicht negativ-geladenen Proteine durch das Gel. Nach etwa 1 h konnte das SDS-Gel in einer Färbelösung mit 0,1% Coomassie Blue R 250 und folgender Entfärbung visualisiert werden. Anhand eines aufgetragenen Proteinstandards für globuläre Proteine (Fa. GE Healthcare) wurde das apparente Molekulargewicht der Proteinbanden einer Probe abgeschätzt.

Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und des Polyacrylamidgel für 4 Gele

SDS – Sammelgelpuffer

0,5 M Tris, pH 6,8
0,4% (w/v) SDS

SDS – Trenngelpuffer

1,5 M Tris, pH 8,8
0,4% (m/v) SDS

SDS – Laufpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
194 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

2 x SDS-Probenpuffer

62,5 M Tris-HCl, pH 6,8
1,6% (w/v) SDS
25% (v/v) Glycerin
0,04% (w/v) Bromphenolblau
20% (v/v) β -ME

Färbelösung

40% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure
0,1% (w/v) Coomassie Blue R 250

Entfärbelösung

10% (v/v) Ethanol
5% (v/v) Essigsäure

<u>Bestandteil</u>	<u>15% Trenngel</u>	<u>18% Trenngel</u>	<u>20% Trennge I</u>	<u>6% Sammelgel</u>
ddH ₂ O	4,8 ml	2,8 ml	2,0 ml	2,7ml
30% Acrylamid	10 ml	12 ml	12,8 ml	1,0 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml	
Sammelgelpuffer	-	-		1,25 ml
10% SDS	200 μ l	200 μ l	200 μ l	50 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	2,5 μ l

3.8.9 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von Protein-RNA-Komplexes aus Larp7 und der 7SK snRNA erfolgte in einem Harnstoff-Polyacrylamidgel, welches eine sensitive, denaturierende Methode zur Darstellung von RNAs darstellt. Hierfür wurde das Retentionsverhalten von Larp7 und der 7SK snRNA sowie des Komplexes in einem analytischen Gelfiltrationslauf analysiert und die Fraktionen der Läufe gesammelt. Proben der 7SK snRNA sowie des potentiellen Komplexes wurden durch LiCl-Isopropanolfällung (3.8.10) präzipitiert und in Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proben wurden nach Aufkochen bei 95°C auf 10%ige Harnstoff-Polyacrylamidgele im Bio-Rad Mini-Protean III-System aufgetragen und in TBE-Puffer einer Stromstärke von 20-25 mA ausgesetzt. Durch Inkubation der Gele in 0,01% Ethidiumbromid konnten die RNA-Banden anschließend unter UV-Licht-Bestrahlung visualisiert werden. Die gesammelten proteinenthaltenden Fraktionen wurden zum Vergleich parallel in 15%igen SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und durch Coomassie Blue-Farbstoff visualisiert (3.8.8). Hierfür wurden 30 µl der Fraktionen mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C auf 20 µl eingeeengt.

10% Harnstoff- Polyacrylamidgele (für 2 Gele 10 ml)
 7 M Harnstoff
 10% Acrylamid (19,5 Acrylamid: 1 N,N'-Bisacrylamid)
 12 µl TEMED
 30 µl 10% APS
 In 1x TBE-Puffer

Formamid-Auftragspuffer
 80% (v/v) Formamid
 0,1% (w/v) Xylencyanol
 0,1% (w/v) Bromphenolblau
 in 1 x TBE-Puffer

3.8.10 LiCl-Isopropanolfällung von RNAs

Da die Konzentration des 7SK snRNA-Konstrukts in den durchgeführten analytischen Gelfiltrationsläufen zu gering für einen direkten Nachweis war, wurde die RNA durch eine LiCl-Isopropanol-Fällung präzipitiert und in einem geringeren Volumen aufgenommen. Hierfür wurden 200 µl der gesammelten Fraktionen mit 200 µl Isopropanol und 20 µl 8 M LiCl versetzt. Als Trägersubstanz wurden 2 µl Glykogen (20 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei -80°C inkubiert. Die Proben wurden 15 min bei 15 000 x g zentrifugiert und die Pellets nach Abnahme des Überstandes mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 min bei 15 000 x g wurden die Proben getrocknet und nach der Aufnahme in Formamidpuffer in einem 10%igem Harnstoff-Polyacrylamidgel analysiert (3.8.9).

3.8.11 GST-Immobilisationsexperiment

Protein-Protein-Interaktionen können über ein GST-Immobilisationsexperiment untersucht werden. Dabei wird eines der Proteine als GST-Fusionsprotein an einer GSH-Matrix immobilisiert. Bei Zugabe eines Bindungspartners wird dieser durch die Interaktion ebenfalls immobilisiert. Die Proteine können anschließend per SDS-PAGE analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein GST-Immobilisationsexperiment verwendet, um eine potentielle Verdrängung von Hxm1 durch Zugabe von Brd4 CT untersuchen zu können. Dieses Experiment orientierte sich an der beschriebenen Verdrängung der Hxm1 TBD durch Tat/TAR von den Cyclinboxen von CycT1 (Barboric et al., 2007).

Herstellung von immobilisiertem GST-Protein

Zur Immobilisierung von GST-CycT1 (1-281) an GSH-Matrix (GE Healthcare) wurde GST-CycT1 in einer 500 ml-Kultur für 6 h durch Zugabe von 0,3 mM IPTG exprimiert. Die pelletierten Zellen wurden in PBS-Puffer + 1 mM PMSF gelöst und durch Ultraschall aufgeschlossen (3.8.1). Nach 30 min Inkubation bei 4°C in Anwesenheit von 1% Tween 20 wurde das Zellysate durch Zentrifugation bei 10 000 x g geklärt und der Überstand mit 1,0 ml GSH-Matrix-Lösung in PBS + 1% Tween 20 versetzt. Nach 3 h Inkubation bei 4°C unter ständigem Durchmischen wurde der Überstand durch Zentrifugation von der GSH-Matrix separiert und entfernt. Nach 4 Waschschritten mit PBS-Puffer wurde die GST-CycT1-Matrix nach Schockgefrieren bei -80°C gelagert.

Durchführung des GST-Immobilitätsexperiment

Zur Untersuchung der Verdrängung von Hexim1 durch Tat/TAR und potentiell Brd4 CT wurden 6 µl der hergestellten GSH-Matrix mit immobilisiertem CycT1 (1-281) pro Ansatz verwendet (~ 2 µg CycT1) und in einem 300 µl-Ansatz mit 20 µl unbeladenen GSH-Matrix und Bindepuffer (20 mM Tris, pH 7,4, 100 mM NaCl, 20 mM Zn Cl₂, 0,5% NP-40, 5 mM β-ME) vermischt. Diesem Ansatz wurden 0,4 nmol Hxm1 TBD zugesetzt. Anschließend wurden ansteigende Mengen eines Tat/TAR-Gemisches (3:1 Tat:TAR) oder CT zugegeben (0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 nmol) und der Ansatz für 45 min bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Als Kontrolle wurden 5 µl Matrix, an der nur GST immobilisiert war, mit den Proteinen inkubiert. Nach der Reaktion wurde die Matrix durch leichte Zentrifugation sedimentiert, der Überstand entfernt und in zwei Waschschrritten durch frischen Puffer ersetzt. Schließlich wurde die GST-CycT1-Matrix in 30 µl SDS-Probebuffer aufgenommen und denaturiert. Nach einer erneuten Sedimentation wurden 10 µl des Überstandes auf einem 20%-igem SDS-Gel getrennt und visualisiert.

3.8.12 Elektrophoretischer Gelverschiebungstest (EMSA)

Als Bindungsassay zur Untersuchung der Interaktion von Larp7 und der 7SK snRNA wurde ein Elektrophoretischer Gelverschiebungstest (EMSA, engl. *electrophoretic mobility shift assay*,) eingesetzt (Garner und Revzin, 1981; Hellman und Fried, 2007). In diesem nativen Glycinacrylamidgelsystem wird die Laufgeschwindigkeit einer freien RNA im Vergleich zu einer durch die Bindung eines Proteins verlangsamten RNA zur Anode untersucht. Zur Trennung der unterschiedlichen RNA-Proteinkomplexe wurde ein 5%-iges Polyacrylamidgel in einem Bio-Rad Mini-Protean III-Gelsystem gegossen. Sowohl für die Herstellung des Gels als auch für alle verwendeten Puffer wurden RNase-freie Chemikalien eingesetzt.

In einem 10 µl Reaktionsansatz wurde 1-2 µM RNA mit ansteigenden Mengen des entsprechenden Proteins in Bindepuffer vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Untersuchung im EMSA wurde die verwendete RNA für 1 min auf 80°C erhitzt, um eine homogene Faltung der RNA bei langsamer Abkühlung auf RT zu gewährleisten. Gegebenenfalls wurde der Ansatz zudem mit 5 µg Heparin versetzt, um unspezifische Interaktionen der RNA mit Larp7 zu unterbinden (Ryder et al., 2008). Die RNA-Proteinprobe wurde vor dem Auftrag auf das Gel mit 6x-Probenpuffer aus 50% Glycerin und 0,042% Bromphenolblau versetzt und in gekühltem 1x EMSA-Puffer im Gel einer

Stromstärke von 25 mA für 30 bis 90 Minuten ausgesetzt. Die RNA-Banden im Gel wurden durch Inkubation mit 0,01% Ethidiumbromid und anschließender in UV-Lichtbestrahlung visualisiert.

<u>10 x EMSA-Puffer</u>	<u>Bindepuffer</u>	<u>5% Polyacrylamidgel</u>
250 mM Tris, pH 8,5	30 mM Tris, pH 7,5	1 ml 10 x EMSA-Puffer
1,92 M Glycin	70 mM KCl	1,25 ml 40% Acrylamid
10 mM EDTA	5,5 mM MgCl ₂	7,7 ml ddH ₂ O
	5 mM DTE	12 µl TEMED
		30 µl APS

3.8.13 Kinaseassay

Die Aktivität von P-TEFb wurde einem *in vitro*-Kinaseassay untersucht, in welchem rekombinant-gereinigtes Cdk9/CycT1 in Anwesenheit eines GST-CTD-Substrats und ATP vermengt und die Wirkung potentieller Regulatorproteine getestet wurde (Hastie et al., 2006; Czudnochowski, 2009). Die Kinaseaktivität der P-TEFb-Untereinheit Cdk9 wurde anhand der Menge der übertragenen Phosphatgruppen von ATP auf das Substrat quantifiziert und in Relation zur unbeeinflussten Kinaseaktivität gesetzt. Zur Quantifizierung der Kinasereaktion wurde radioaktiv-markiertes ATP eingesetzt, dessen γ -Phosphatgruppen den β -Strahler ³²P enthielten und in einem Filterbindungsassay durch einen Szintillationszähler nachgewiesen werden konnte. Alternativ konnte die Kinasereaktion auch mit nicht-strahlendem ATP durchgeführt und die Übertragung der Phosphatgruppen über Massenspektrometrie oder als Laufverschiebung im SDS-PAGE-Gel untersucht.

Filterbindungsassay

In einem Reaktionsansatz wurden 0,1 µM P-TEFb mit 100 µM GST-CTD-Substrat in einem Volumen von 35 µl in Kinasepuffer (50 mM HEPES, pH 7,6, 34 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 5 mM β -Glycerophosphat) vermischt. Hxm1-Konstrukte wurden im 20-fachen Überschuss (2 µM) zugegeben, von CT-Konstrukten wurden 10 µM eingesetzt. ATP wurde mit 0,024-0,036 µCi/µl radioaktivem γ -ATP (Perkin Elmer) versetzt (dies entsprach 0,165-0,25 µCi/Reaktionsansatz) und in einer Gesamtkonzentration von 100 µM als letzter Zusatz zum Reaktionsansatz gegeben. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert und nach 15 min in zwei Ansätzen (15 µl) auf P81-Phosphozellulosepapier (Fa. Omnilab) pipettiert. Nach drei Waschrufen à 5 min in 0,75%iger Phosphorsäure zur Entfernung des überschüssigen ATPs wurden die Papierstücke entnommen und ihre Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationszähler (Fa. Beckmann Coulter) quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz nur mit P-TEFb, Substrat oder ATP gemessen, als Negativkontrolle wurden die bekannten Inhibitoren Flavopiridol oder Hexim1 (2 µM) zugegeben und gemessen. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Zeitaufgelöste Messung der Kinasereaktion

Zur Quantifizierung der Phosphatgruppenübertragung über einen bestimmten Zeitraum wurden wie oben beschrieben Ansätze vorbereitet und nach Zugabe von ATP für eine definierte Zeit von 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 und 360 min bei 30°C inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µM

Flavopiridol oder 50 mM EDTA beendet und die Proben bei 4°C gelagert. Nachdem alle Reaktionen beendet waren, wurden die Ansätze wie oben beschrieben auf Phosphozellulosepapier übertragen und ihre radioaktive Strahlung quantifiziert.

Nachweis der Phosphatgruppenübertragung durch Massenspektrometrie

Alternativ zur radioaktiven Markierung und Nachweis der γ -Phosphatgruppe konnte die Übertragung der Phosphatgruppe auf das Substrat auch durch die Veränderung des Molekulargewichts des Substrats um 80 Da je übertragener Phosphatgruppe elektrophoretisch und massenspektrometrisch beobachtet werden. Hierfür wurden Ansätze wie beschrieben angesetzt und über einen definierten Zeitraum hinweg inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde 2 μ M Flavopiridol oder 50 mM EDTA zum Ansatz gegeben. Der Phosphorylierungszustand des Substrats konnte nun elektrophoretisch durch Auftrennung von 5 μ l des Ansatzes auf einem 20%-igen SDS-Gel analysiert werden. Dabei bewirkte die Phosphorylierung des Substrates typischerweise eine verkürzte Laufweite der CTD-Bande.

Bei Verwendung von 25 μ l des Ansatzes zur Aufnahme eines ESI-Massenspektrums konnte die genaue Masse des vorliegenden Substrats im Ansatz bestimmt werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode ermöglichte dies die direkte und exakte Quantifizierung der Anzahl der Phosphorylierungen des GST-CTD-Substrats.

3.9 Biophysikalische Methoden

3.9.1 Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS)

Für biochemische und strukturbiochemische Arbeiten mit rekombinanten Proteinen ist die genaue Bestimmung der Masse eines Proteins zur Bestätigung der Identität und Analyse von posttranslationalen Modifikationen von essentieller Bedeutung. Mit Hilfe der Massenspektrometrie werden Proteinproben ionisiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt, in welchem sie sich aufgrund ihrer positiven Ladung zu einer Kathode bewegen. Da der Grad der Ionisation mit der Größe des Proteins zunimmt, ist die Geschwindigkeit, mit welcher sie die Kathode erreichen, proportional zu ihrem Molekulargewicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins die Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS) mit einem Finnigan LCQ Advantage MAX Elektrospraymassenspektrometer (Fa. Thermo Fisher Scientific, Corston, UK) eingesetzt. Die Ionisation einer Proteinprobe (~ 20 μ l á 1 mg/ml) erfolgt hierbei durch die schrittweise Injektion der Lösung durch eine Kapillare in ein elektrisches Feld. Um Oxidationen während der Desolvatation zu vermeiden, wurde die Probe vor der Injektion durch ein vorgeschaltetes Agilent 1100 HPLC-System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) über eine C₄-Säule (Grace, Deerfield, USA) entsalzt. In einem elektrischen Feld wurde die Flugzeit TOF (engl. *time of flight*) der ionisierten Proteinproben zur Kathode gemessen, welche vom Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) abhängt und zur Ermittlung des Molekulargewichts der Probe verwendet wird. Die Auswertung der aufgenommenen Massenspektren erfolgte mit Hilfe der Programme Xcalibur und MagTran.

3.9.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine sehr sensitive Methode, die in einem thermisch isolierten und kontrollierten System die Veränderung der Temperatur eines Systems durch freiwerdende oder aufgenommene Wärme bei Ablauf einer exothermen Reaktion misst. Hierfür werden eine Messzelle und eine Referenzzelle auf eine definierte, identische Temperatur gebracht. In die Messzelle, die den einen Reaktionspartner enthält, wird nun der zweite Reaktionspartner schrittweise titriert, wobei auftretende Temperaturschwankungen vom ITC-Gerät ausgeglichen werden. Aus dem benötigten Strom zum Ausgleich der Temperaturdifferenz kann die Enthalpie einer Reaktion errechnet werden. Dabei wird aus der detektierten Wärmetönung die Enthalpie der Reaktion bestimmt, während der Verlauf der integrierten Wärmetönung gegen das in der Zelle vorliegende molare Verhältnis der Reaktanten die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K und der Stöchiometrie der Reaktion ermöglicht. Aufgrund des Zusammenhangs der Gibbs-Helmholtz-Gleichung und der Gleichgewichtskonstanten über die Freie Gibb'sche Energie

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{und} \quad \Delta G^0 = -RT \ln K$$

kann somit die Freie Gibb'sche Energie ΔG^0 sowie die Änderung der Entropie ΔS^0 des Systems berechnet werden. Eine Abschätzung der für ein Titrationsexperiment benötigten Konzentrationen der verwendeten Proteine/Peptide erfolgte durch Berechnung des C-Wertes, welcher sich aus $C = K_a \cdot c(\text{Zelle}) \cdot n$, ergibt, wobei n:1 einer 1:1-Bindung entspricht. Bei der Wahl der Konzentration der Komponente in der Zelle sollte sich ein C-Wert von 5-100 ergeben, da Titrationskurven innerhalb dieser Grenzen zuverlässig angepasste Bindungskurven gewährleisten (Feig, 2007). Der Titrant in der Spritze sollte zehnfach höher konzentriert eingesetzt werden als das Protein in der Zelle.

Zur Messung der Interaktion zwischen BD1 und BD2 mit modifizierten Histonpeptiden wurden daher bis zu 6 mM des Reaktionspartners in der Spritze eingesetzt. Es wurde ein iTC200-Gerät der Firma GE Healthcare verwendet, welches ~60 μl Titrant in der Spritze und ~250 μl Protein/Peptid in der Zelle erforderte. BD1 wurde stets aus der Spritze in die Peptidlösung titriert, der verwendete ITC-Puffer entsprach dem Gelfiltrationspuffer von BD1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100-150 mM NaCl, 1 mM TCEP). Bei Messungen mit BD2 wurde der Versuchsaufbau wegen schwankender Löslichkeit des Proteins variiert, als Puffer wurden 50 mM HEPES, pH 7.0 150 mM NaCl, 1 mM TCEP verwendet. Beide Proteine waren in diesem Puffer gereinigt oder dialysiert worden. Genaue Titrationsschemata, Konzentrationen der Experimente sowie unter 4.2 nicht gezeigte ITC-Messungen sind im Anhang in Tabelle 5 aufgelistet. Die Messtemperatur lag bei 25°C. Zu den Messungen der potentiellen Bindung von Protein und Peptid wurden als Kontrollmessungen stets auch die Wärmetönung bei der Titration des Titranten in Puffer und von Puffer in die vorgelegte Lösung gemessen und auftretende Signale gegebenenfalls von der Protein:Peptid-Messung subtrahiert. Die Auswertung der gemessenen Bindungskurven erfolgte durch die Software Origin 7.0.

Die Interaktion von Brd4 CT mit dem Transkriptionsfaktor P-TEFb erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5% Glycerin, 1 mM MgCl_2 , 5 mM β -ME bei 15°C. Dabei wurden 80 μM CT zu 8 μM P-TEFb in die Zelle titriert.

3.9.3 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie stellt eine schnelle Methode zur Abschätzung der Sekundärstruktur eines Proteins in Lösung dar. Rechts- und links-zirkular polarisiertes Licht wird bei der Interaktion mit chiralen Molekülen unterschiedlich stark absorbiert und führt bei der Überlagerung des polarisierten Lichtes zu einer elliptischen Verschiebung, welche als Zirkulardichroismus (engl.: *circular dichroism*) bezeichnet wird. Sekundärstrukturelemente in Proteinen wie α -Helizes zeigen verstärkte Wechselwirkungen mit zirkular polarisiertem UV-Licht, die für das Strukturelement charakteristisch sind und anhand von Referenzspektren die Zuordnung der relativen Sekundärstruktur eines gemessenen Proteins ermöglichen.

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturen der in dieser Arbeit verwendeten CT- und Larp7-Konstrukte wurden 0,5-5 μ M des entsprechenden Proteins in 5 mM KP_i -Puffer, pH 7,5, verdünnt und in zirkular polarisiertem Licht von 260-190 nm in 1 nm-Schritten bei einer Integrationszeit von 1 sec und einer Pfadlänge von 2 mm gemessen. Die Messungen von zehn CD-Spektren, die im Anschluss gemittelt wurden, erfolgten bei einer Temperatur von 25°C, die Kühlung des CD-Spektrometers wurde durch 3 l/min flüssigen Stickstoffs gewährleistet. Die gemessene Intensität I der Spektren wurde in die mittlere molare Elliptizität pro Rest $\theta = I / d \cdot c \cdot n$ (mit θ : mittlere molare Elliptizität pro Rest ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$); I : Intensität (mdeg); d : Pfadlänge; c : Konzentration des Proteins (M); n : Anzahl der Aminosäuren des Proteins) umgerechnet. Die Ermittlung der Sekundärstrukturelemente aus den gemessenen CD-Spektren erfolgte durch das Programm Dichroweb (www.dichroweb.cryst.bbk.ac.uk), dabei wurde das Analyseprogramm CDSSTR unter Verwendung des Referenz-Datensatzes SP175 zur Ableitung der Sekundärstruktur verwendet, für welchen die CD-Spektren von etwa 60 Proteinen mit deren bekannter Sekundärstruktur korreliert wurden. (Whitmore und Wallace, 2008).

3.9.4 Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Die zentrale Methode zur Bestimmung der Struktur der in dieser Arbeit untersuchten Bromodomänen BD1 und BD2 von dem P-TEFb-Interaktionspartner Brd4 stellt die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen dar. Aufgrund der hohen Komplexität dieser Methode soll hier auf die Grundlagen der Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse nur übersichtsweise eingegangen werden. Eine detaillierte Darstellung der Proteinkristallographie und ihrer Grundlagen kann beispielsweise in „Biomolecular Crystallography“ von B. Rupp nachgelesen werden (Rupp, 2010).

Theoretischer Hintergrund

Beugung von Röntgenstrahlung an einem Proteinkristall

Röntgenstrahlung der Wellenlänge $10^{-8} - 10^{-12}$ m wird bei Kontakt mit Proteinen durch diese gebeugt, wobei die Ablenkung des Strahls von der Position der Atome innerhalb des Proteins abhängt und eine Bestimmung der Struktur ermöglicht. Da Röntgenstrahlung jedoch anders als Licht im sichtbaren Bereich nicht durch eine Linse fokussiert werden kann, werden Beugungssignale einer inversen Fouriertransformation als Ersatz der Linsenfokussierung unterzogen, um die Struktur des Moleküls zu berechnen. Da die

Interaktionen zudem sehr schwach sind, werden zur Aufnahme von Beugungsmustern Einkristalle des Proteins eingesetzt, die durch die regelmäßige Anordnung der Proteine eine Verstärkung der Beugungssignale ermöglichen.

Die Herstellung von Proteinkristallen stellt die erste Hürde der Röntgenstrukturanalyse dar. Proteinkristalle werden durch schrittweise Erhöhung der Konzentration des Proteins bis zur Übersättigung gewonnen, durch welche eine kontrollierte und regelmäßige Anordnung des Proteins im Kristall erreicht wird. Hierfür wird ein Kristallisationstropfen aus Protein und einer Kristallisationslösung luftdicht über einem Reservoir mit Kristallisationslösung platziert. Durch den osmotischen Druck innerhalb des Systems diffundiert Wasser aus dem Proteintropfen und erhöht zunehmend die Konzentration, bis schließlich die Nukleation und Kristallisation des Proteins erreicht werden kann.

Röntgenbeugungsexperiment

Bei der Bestrahlung eines Kristalls mit Röntgenstrahlung werden die elektromagnetischen Wellen des Röntgenlichts an den Gitterpunkten des Kristalls gebeugt. Durch positive und negative Interferenzen entstehen nur dann Beugungssignale (Reflexe), wenn die Bragg'sche Bedingung $2d \sin\theta = n\lambda$ (d : Abstände der Gitterpunkte; θ : Winkel der einfallenden Röntgenstrahlen; n : Beugungsordnung und λ : Wellenlänge) erfüllt ist. Da die Bragg'sche Bedingung jedoch bei einer statischen Kristallorientierung nicht alle möglichen Reflexe eines Kristalls zulässt, wird zwischen den einzelnen Beugungsexperimenten der Kristall um den Winkel ϕ gedreht, um so alle möglichen Reflexe eines Kristalls zu erhalten. Reflexe des gleichen Gitterpunktes können hinterher vereint und gemittelt werden.

Die entstehenden Reflexe der Beugung werden durch einen Detektor aufgezeichnet. Die Position der Reflexe im Beugungsmuster ist abhängig von dem Kristallgitter, in welchem die Proteine kristallisierten und an welchem die Röntgenphotonen gestreut wurden. Die Intensität ist dagegen abhängig von der Struktur des kristallisierten Proteins. Bei der Wellendarstellung jedes einzelnen Röntgenphotons entspricht die Intensität des Beugungssignals der Amplitude der elektromagnetischen Welle. Die Phase, mit welcher die Welle oszillierte, ist jedoch in dem Beugungsmuster nicht enthalten.

Berechnung der Struktur aus dem Röntgenbeugungsbild/Phasenproblem

Die Bestimmung der Phasen der einzelnen elektromagnetischen Wellen stellt den entscheidenden Schritt zur Berechnung der Struktur des Proteins aus den gemessenen Reflexen dar. Einige Methoden zur Ermittlung der Phasen umfassen die Inkorporierung des Methionin-Analogons Selenomethionin oder von Schwermetallen in den Kristall, um über die Veränderung der Elektronendichte bei Verwendung von Röntgenstrahlung definierter Wellenlängen die Phasen berechnen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Phasen der Reflexe über den Molekularen Ersatz berechnet. Dafür wird zur Lösung einer unbekanntenen Struktur die bekannte Struktur eines ähnlichen Proteins (typischerweise ist eine Sequenzidentität von >30% notwendig) eingesetzt und unter der Annahme, dass dessen Phasen den gesuchten Phasen ähneln, zur Berechnung der Struktur verwendet. Das bekannte Protein wird durch Translations- und Rotationsfunktionen innerhalb der Einheitszelle des Kristalls positioniert und die Phasen dieses Modells als initiale Phasen einer gesuchten Struktur

verwendet. Gelingt der Molekulare Ersatz, kann ein initiales Modell der berechneten Elektronendichte angepasst und verfeinert werden, um die tatsächlichen Phasen zu ermitteln.

Verfeinerung eines Strukturmodells

Nachdem ein erstes Modell der Struktur berechnet wurde, wird in iterativen Schritten durch manuelle Anpassung des Modells an die Elektronendichte und einer automatisierten Verfeinerung auf Grundlage des *Maximum-Likelihood*-Prinzips versucht, die tatsächliche Struktur des Proteins im Kristall zu ermitteln.

Zur Beurteilung der Übereinstimmung eines erstellten Modells mit der vorliegenden Struktur werden die Strukturfaktoren der gemessenen Reflexe (F_{obs}) mit den Strukturfaktoren des Modells (F_{calc}) verrechnet. Die Strukturfaktoren entsprechen dabei der vektorialen Darstellung der Wellenfunktionen der Moleküle im Kristall. Es ergibt sich der sogenannte R-Faktor (R_{fact}), welcher ein Maß für die Güte eines Modells darstellt und möglichst gering sein sollte: $R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, wobei F_{obs} den gemessenen und F_{calc} den berechneten Strukturfaktoren eines Modells entsprechen. Da für die Berechnung der Strukturfaktoren stets die ermittelten Phasen verwendet werden, kann eine Überinterpretation durch Verfälschung der Phasen und des R_{fact} auftreten. Um dies zu vermeiden, wird der R_{free} berechnet (Brunger, 1992), der aus 5% unbeeinflussten Reflexen berechnet wird, welche von den folgenden Verfeinerungsschritten ausgenommen werden. Diese können durch verfälschte Phasen nicht beeinflusst werden und werden zur Berechnung des unabhängigen R_{free} verwendet.

Praktische Durchführung in dieser Arbeit

Kristallisation von Brd4 BD1 und BD2

Zur Gewinnung von Kristallen der Brd4 BDs wurden die Proteine BD1 42-168 sowie BD2 349-464 gereinigt (3.8.2-3.8.5) und auf Kristallbildung in Kristallisationsscreens (Fa. Qiagen) untersucht. Dies erfolgte zunächst in 96fach-Kristallisationsplatten (Fa. Greiner oder Fa. Corning) mit 60-75 μl Reservoir, bei denen in den Kristallisationsvertiefungen 100 nl des Reservoirs mit 100 nl Proteinlösung unter Verwendung eines Mosquito Kristallisationsroboters (Fa. TTP Labtech) vermischt wurden. Pro Platte wurden 1-3 verschiedene Proteinlösungen variierender Konzentrationen angesetzt und in einer Inkubations- und Visualisierungseinheit (Rock Imager, Fa. Formulatrix) gelagert, welche die Entwicklung der Kristallisationsansätze über den Zeitraum von 21 Tagen bei 20°C dokumentierte.

Für Brd4 BD1 konnte Kristallbildung im JCSG IV-Screen (Fa. Qiagen) in 3,6 M Na-Format und 10% Glycerin bei Proteinkonzentration von 7,5 bis 20 mg/ml beobachtet werden. Kristalle von 100 x 50 x 20 μm Größe konnten in einer 24-fachen Kristallisationsplatte bei einer Konzentration von 20 mg/ml gewonnen werden, wofür 1 μl des Proteins und 1 μl der Reservoirlösung auf ein Deckgläschen pipettiert und kopfüber über ein Reservoir von 600 μl platziert wurden (*Hanging-Drop-Methode*). Reservoir und Deckgläschen wurden durch Silikon luftdicht verschlossen. Brd4 BD2 zeigte initiale Kristalle im PEG I Screen (Fa. Qiagen) in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 25% PEG Monomethyl Ether 2000 bei 7,3 und 14,6 mg/ml. Die Kristallisationsbedingung wurde auf eine 24-fache Kristallisationsplatte

übertragen und 1 μ l Protein + 1 μ l Reservoirlösung über 600 μ l Reservoir (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 25% PEG 2000 MME) inkubiert. Die Kristalle erreichten bei 14,6 mg/ml Proteinkonzentration Kantenlängen von 200 x 150 x 20 μ m. Die BD1 und BD2-Kristalle wurden in Reservoirpuffer, dem 20% Ethylenglykol zugesetzt wurde, überführt und nach 5-10 s in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Verwendung von 20% Ethylenglykol beim Frieren der Kristalle sollte die Bildung von Eiskristallen in den Lösungsmittelkanälen der Kristalle minimieren, welche das Röntgenbeugungsmuster des Kristalls beeinträchtigen könnten. Gewonnene Kristalle konnten in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden.

Herstellung von Kristallen des Bromodomänen-Histonpeptidkomplexes

Zur Komplexierung von Brd4-Bromodomänen mit Histonfragmenten wurden Kristalle von BD1 in einen Kristallisationstropfen von 3 μ l überführt, in welchem die Reservoirlösung mit 10- bis 30-fachem Überschuss des Histonpeptids (relativ zur ursprünglich eingesetzten Proteinkonzentration von 1,3 mM BD1) zugesetzt worden war. Ein 20-facher Überschuss der Peptidlösung (26 mM in Reservoirlösung) erwies sich als optimale Peptidkonzentration, und BD1-Kristalle wurden für 24 h in der Lösung über 600 μ l der Reservoirlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kristalle in eine Reservoir-Peptid-Lösung überführt, die zusätzlich 20% Ethylenglycol enthielt, und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren.

Datensatzaufnahme

Die gefrorenen Kristalle von Brd4 BD1 und BD2 wurden im MPI-internen Röntgenlabor unter Verwendung einer Röntgenbeugungsapparatur (Fa. Marresearch) untersucht und Kristalle mit optimaler Röntgenbeugungsqualität und Auflösung ausgewählt. Durch das Programm MOSFLM (Leslie, 1992) wurden die Raumgruppen der Kristalle sowie die Kantenlängen der Einheitszelle bestimmt. BD1 kristallisierte in der Raumgruppe 19 ($P2_12_12_1$), während BD2 in der verwandten Raumgruppe 18 ($P2_12_12$) Kristalle bildete. Röntgenbeugungsdatensätze der BD1 und BD2-Kristalle wurden am SLS (Swiss Light Source) Synchrotron, Villigen, Schweiz, bei 77 K an der Röntgenquelle SLS X10SA aufgenommen. Die Kristalle erreichten Auflösungen von 1,4-1,8 Å für Datensätze von Brd4 BD1 alleine oder mit Histonpeptiden und 1,3 Å für Brd4 BD2-Kristalle bei einer Wellenlänge von 1,0 Å (Details siehe Tabelle 6 im Anhang).

Strukturlösung

Die Analyse der aufgenommenen Beugungsmuster der einzelnen Datensätze erfolgte durch das Programmpaket XDS (Kabsch, 2010), welches die Positionen und Intensitäten der einzelnen Reflexe analysiert, auflistet und jene gleichen Ursprungs mittelt. Aus den identifizierten Reflexen wurde eine initiale Elektronendichtekarte berechnet. 5% der Reflexe werden durch die CCP4-Programme sfall und cad (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) zur Berechnung des R_{free} -Fehlers von weiteren Manipulationen ausgeschlossen. Zur Lösung des Phasenproblems wurden die Strukturen von Brd4 BD1 und BD2 vom *Structural Genomic Consortium* (SGC) Oxford (PDB: 2OSS; 2OUO; Filippakopoulos et al., 2007; SGC Oxford), als molekularer Ersatz verwendet. Hierfür wurde das Programm Molrep eingesetzt (Vagin und Teplyakov, 1997). Das ermittelte, initiale Modell

wurde in dem Modellbauprogramm Coot (Emsley und Cowtan, 2010) manuell der Elektronendichte angepasst und um zusätzliche Bestandteile wie Ethylenglykol oder Wasser ergänzt. Iterative Zyklen der manuellen Anpassung und der Verfeinerung durch das Programm Refmac (Murshudov et al., 1997) führten schließlich zu Modellen minimaler R-Faktoren $F_{\text{fact}}/R_{\text{free}}$. Dabei wurde auch eine Anisotropie der Atome im Kristall über eine TLS-Verfeinerung korrigiert und eine anisotrope B-Faktor-Verfeinerung bei Strukturen hoher Auflösung (BD2 mit 1,3 Å) angewendet.

Die Strukturen der Komplexe aus BD1 und Histonpeptiden wurden auf Grundlage der zuvor berechneten Struktur von BD1 gelöst und konnte direkt über einen *Rigid-Body*-Verfeinerung durch Refmac (Murshudov et al., 1997) errechnet werden (Details siehe Tabelle 6 im Anhang).

Strukturdarstellung

Nach der Verfeinerung des Modells wurde die Sekundärstruktur der Proteine durch das Programm DSSP (Kabsch und Sander, 1983) zugeordnet. Die Darstellung des Strukturmodells erfolgte durch das Graphikprogramm PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, LLC.). Darstellungen der Elektronendichte der Strukturen wurden durch Coot (F_oF_c - und $2F_oF_c$ -Dichte) oder PyMOL ($2F_oF_c$ -Dichte) erstellt. Berechnungen der elektrostatischen Oberfläche der Proteine wurde durch die PyMOL-Erweiterung APBS (Baker et al., 2001) durchgeführt. Bindungslängen von hydrophoben Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken wurden mit Hilfe von PyMOL oder dem CCP4-Programm Contact errechnet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zwei Regulatoren des P-TEFb Komplexes genauer charakterisiert werden: Die ersten beiden Abschnitte befassen sich mit dem Bromodomänen-enthaltende Protein 4 (Brd4), welches die Überführung von P-TEFb vom inhierten in den aktivierten Zustand vermittelt und gleichzeitig für die Lokalisation des Transkriptionsfaktors an Histone verantwortlich ist. Zuerst sollte unter 4.1 der Bereich in Brd4 identifiziert werden, der für die Bindung und Aktivierung von P-TEFb benötigt wird. Abschnitt 4.2 fokussiert auf die beiden Bromodomänen von Brd4 und deren Interaktion mit modifizierten Lysinen in Histonfragmenten und der P-TEFb Untereinheit CycT1.

Der Teil 4.3 befasst sich mit dem RNA-Bindungsprotein Larp7 (engl. *La-related Protein 7*), das erst vor kurzem als weiterer Cofaktor von Hexim1 und die 7SK snRNA gefunden wurde und die 7SK snRNA stabilisiert. Dabei wurden Larp7-Konstrukte nukleinsäurefrei gereinigt und auf ihre biochemischen Eigenschaften, sowie ihre Interaktion mit der 7SK snRNA hin untersucht.

4.1 Funktionelle Untersuchungen der Aktivierung von P-TEFb durch Brd4

Zu Beginn dieser Arbeit war die Interaktion von Brd4 mit dem Transkriptionsfaktor P-TEFb nur unzureichend charakterisiert. Zwei Veröffentlichungen beschrieben die beiden Bromodomänen von Brd4 (Abbildung 13, orange und rot) als P-TEFb-interagierende Regionen (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Bromodomänen sind jedoch auch als Erkennungsdomäne von modifizierten Acetyllysinsegmenten bekannt und wurden in Brd4 für die Interaktion mit acetylierten Histonen verantwortlich gemacht (Dey et al, 2003).

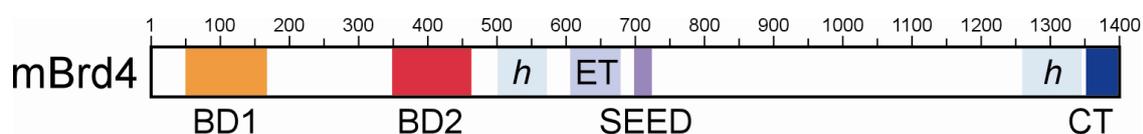


Abbildung 13: Domänenarchitektur des murinen Bromodomänen-enthaltenden Proteins 4 (mBrd4). N-Terminal besitzt Brd4 zwei Bromodomänen, BD1 (orange) und BD2 (rot), die als Erkennungsdomäne für lysinacetylierte Histonmotive fungieren. Die zentrale extraterminale (ET) Domäne (blau) ist zusammen mit den BDs spezifisch für BET-Familie-Proteine, ihre Funktion jedoch bislang nicht geklärt. In hellblau sind zwei Bereiche mit prognostizierter helikaler Faltung eingezeichnet. Auch die Funktion der folgenden SEED-Domäne (violett), welche einen hohen Anteil an Serinen, Aspartaten und Glutamaten aufweist, ist nicht bekannt (Wu und Chiang, 2007). Die letzten 50 Aminosäuren von Brd4 bilden das C-terminale Motiv (CT), welches als Interaktionspartner für P-TEFb vorgeschlagen wurde.

Eine spätere Studie schilderte dagegen den C-Terminus von Brd4 und nicht die Bromodomänen (Abbildung 12, blau) als Interaktions- und Aktivierungsregion mit P-TEFb (Bisgrove et al., 2007). Ausgehend von diesen beiden Modellen sollten sowohl die Bromo-

domänen (BD) als auch der C-Terminus (CT) von Brd4 auf einen aktivierenden Einfluss auf P-TEFb hin getestet werden. Für die folgenden Experimente wurde wie in den zitierten Veröffentlichungen Brd4 aus der Maus verwendet, das eine 93,1%-ige Identität zu humanem Brd4 aufweist.

4.1.1 Bestimmung der aktivierenden Domäne von Brd4 auf P-TEFb

Darstellung der Proteine zur Untersuchung der Aktivität von P-TEFb

Zur Untersuchung der Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 sollten zunächst die potentiell aktivierenden Domänen von Brd4 BD1 (42-168) und BD2 (349-464) bzw. CT (1351-1400) auf ihre Wirkung auf P-TEFb getestet werden. Die C-terminale Domäne (CT) von Brd4 umfasst die Reste 1351-1400. Da diesem Konstrukt jedoch aromatische Aminosäuren fehlten, wurde zur günstigeren spektrometrischen Detektion zudem ein verlängertes Konstrukt (W1338-1400) erstellt, welches N-terminal ein zusätzliches Tryptophan enthielt.

Der positive Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb, bestehend aus Cdk9 (1-340) und CycT1-His (1-271), wurde in Baculo-Virus infizierten *Sf21*-Insektenzellen exprimiert (Czudnochowski, 2009), um die Funktionalität des Komplexes durch Phosphorylierung an Thr186 zu gewährleisten (Peng et al., 1998a; Chen et al., 2004; Li et al., 2005). Die Identität und der Phosphorylierungszustand des P-TEFb-Heterokomplexes wurden per Massenspektrometrie bestätigt. Als Substrat von P-TEFb, auf welches die γ -Phosphatgruppen des ATPs durch P-TEFb übertragen werden, wurde ein GST-CTD-Konstrukt verwendet. Dieses Fragment enthielt 9 der 52 Heptadwiederholungen der humanen CTD der Rpb1-Untereinheit der RNA-Pol II. Die drei N- und C-terminalen Reste des CTD-Proteins bestehen aus molekularbiologisch eingefügten Lysinen, um eine optimale Bindung des Proteins an den Phosphozellulosefilter im Kinaseassay zu gewährleisten (Czudnochowski, 2009). Der GST-Anker wurde aus Stabilitätsgründen nicht entfernt.

Mit den beschriebenen Proteinen wurde zunächst mittels Massenspektrometrie untersucht, ob das Enzym P-TEFb aktiv vorliegt und Phosphatgruppen von ATP auf das Substrat GST-CTD übertragen werden könne. Zudem sollte der Einfluss der beiden CT-Konstrukte 1351-1400 (Wildtyp) und dem verlängerten W1338-1400 auf P-TEFb verglichen werden, um die Wirkung der beiden CT-Konstrukte vergleichen zu können. Nach einer einstündigen Reaktion des Kinaseansatzes bei 30°C wurden 25 μ l der Reaktion massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 14).

Die Analyse der Massenspektren zeigte für die Kinasereaktion von P-TEFb, ATP und Substrat die Übertragung von 1 bis 3 Phosphatgruppen auf das GST-CTD-Substrat (pro Phosphatgruppe +80 Da; Abbildung 14 A). Dagegen wurde in den Proben mit Wildtyp CT oder verlängertem CT (Abbildung 14 B und C) eine molekulare Masse von 33 820 Da identifiziert, entsprechend einer Übertragung von fünf Phosphatgruppen.

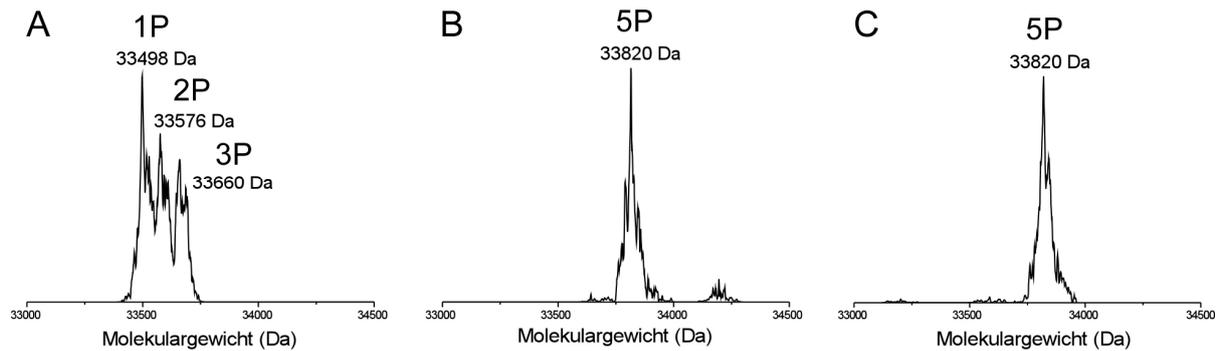


Abbildung 14: ESI-MS-Spektren der Reaktionsansätze mit rekombinant gereinigtem P-TEFb
 A) Massenspektrum der Kinasereaktion von 0,1 μM P-TEFb mit 10 μM GST-CTD Substrat in Anwesenheit von 400 μM ATP nach 60 min, bei der anhand der auftretenden Massen die Übertragung von 1 bis 3 Phosphatgruppen (P) durch P-TEFb auf das Substrat beobachtet werden konnte. B) Bei Zugabe des 10 μM Wildtyp-CTs konnten nach 60 min eine Massenübertragung von etwa 400 Da beobachtet werden, dies entspricht 5 Phosphatgruppen, die übertragen wurden. C) Auch bei Zugabe von 10 μM des längeren W1338-1400- Konstrukts wurden nach 60 min 5 Phosphatgruppen übertragen.

Dieses initiale Experiment zur qualitativen Bewertung der CT-Proteine zeigte, dass zum einen der dargestellte P-TEFb Komplex Kinaseaktivität besitzt, und zum anderen GST-CTD mit neun Heptadwiederholungen als Substrat für P-TEFb geeignet ist. In den folgenden Versuchen wird aufgrund der Übereinstimmung der Wirkung beider CT-Konstrukte (Wildtyp und W1338-1400) das verlängerte Konstrukt W1338-1400 eingesetzt, welches eine optimierte Detektion ermöglicht. Da in Anwesenheit von CT eine erhöhte Phosphatgruppenübertragung durch P-TEFb auf GST-CTD beobachtet wurde, deutet sich hier ein stimulatorischer Effekt von Brd4 CT auf die Aktivität von P-TEFb an, der im Folgenden näher betrachtet wurde. Zunächst sollte jedoch untersucht werden, ob die Aufhebung der Hxm1-Inhibition durch Brd4, wie sie von Jang et al. und Yang et al. beschrieben wurde, durch einzelne Domänen von Brd4 vermittelt wird (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005).

Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 CT aus dem inhibierten Zustand

Das beschriebene Kinase-Substrat-System wurde nun eingesetzt, um den Einfluss verschiedener Brd4-Domänen auf den durch Hxm1-Bindung inhibierten Transkriptionsfaktor P-TEFb hin zu untersuchen. Hierfür wurde neben dem bereits erwähnten CT-Konstrukt W1338-1400 die beiden Bromodomänen BD1 (42-168) und BD2 (349-464) von Brd4 eingesetzt, für die eine Bindung an P-TEFb beschrieben wurde (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Hxm1 zur Inhibition von P-TEFb in den Grenzen 200-359 war bereits zuvor als Konstrukt mit maximaler Inhibition beschrieben worden (Czudnochowski, 2009). Um die Einflüsse der Proteine auf P-TEFb qualitativ und quantitativ zu bestimmen, wurde ein Kinaseassay unter Verwendung von γ - ^{32}P -markiertem ATP verwendet, bei dem der Einfluss der Bromodomänen (BDs) oder CT auf P-TEFb quantifiziert wurde. Als Negativkontrolle wurde der spezifische Cdk9-Inhibitor Flavopiridol eingesetzt, welcher durch Besetzung der ATP-Tasche die Bindung von ATP und damit die Phosphatgruppenübertragung verhindert (Chao und Price, 2001; Baumli et al., 2008). Ein weiterer Kontrollansatz wurde ohne das Enzym P-TEFb durchgeführt, um eine potentielle Kinasekontamination durch die Substrate oder den Kinasepuffer auszuschließen und zugleich das Hintergrundsignal der Reaktion zu bestimmen. GST diente im Vergleich zu den BDs und CT als zusätzliche Negativkontrolle. In

Abbildung 15 sind die Ergebnisse des Kinaseassays graphisch dargestellt. Dabei wurde die gemessene Radioaktivität des Ansatzes von P-TEFb mit γ - 32 P-ATP und Substrat nach 15 min als Richtwert von 100% relativen 32 P-Phosphateinbau als Maß der Kinaseaktivität von P-TEFb gesetzt, während alle weiteren Quantifizierungen relativ zu diesem Wert berechnet wurden.

Wie aus Abbildung 15 deutlich wird, wurde eine nahezu vollständige Inhibition der Kinaseaktivität durch Hxm1 (200-359) auf 4% erreicht und lag somit nur leicht über dem Niveau des Hintergrundsignal (1%). BD1 oder BD2 konnte ebenso wenig wie GST dem inhibitorischen Effekt von Hxm1 auf die Kinaseaktivität von P-TEFb entgegenwirken. Die Bromodomänen von Brd4 scheinen demnach keine Rolle in der Aufhebung der Inhibition von P-TEFb durch Hxm1 zu spielen.

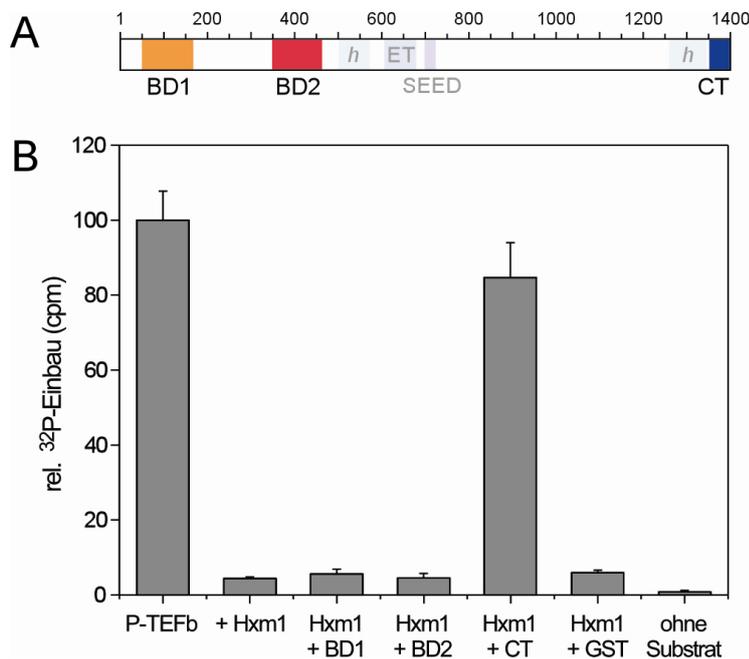


Abbildung 15: Die Aufhebung der Inhibition von P-TEFb durch CT.

A) Die Übersicht der Domänenarchitektur von Brd4 zeigten die untersuchten Bereiche BD1 (42-168) und BD2 (349-464) sowie das C-terminale Fragment CT (W1338-1400). B) Während die Zugabe von 2 μ M Hxm1 eine Inhibition der Aktivität von 0,1 μ M P-TEFb auf 4% bewirkt, kann dieser Effekt durch 10 μ M CT rückgängig gemacht werden. Dabei konnte 85% der Kinaseaktivität durch CT wiederhergestellt werden. BD1, BD2 und GST zeigten keinen Einfluss auf die Inhibition. Eingesetzt wurde 100 μ M GST-Substrat (9 Heptade mit terminale Lysinen) mit 100 μ M ATP bei 30°C. Die Radioaktivität nach Phosphatgruppenübertragung wurde nach 15 min bestimmt.

Dagegen bewirkte die Inkubation des inhibierten P-TEFb Komplexes mit CT eine Wiederherstellung der Kinaseaktivität auf 85% im Vergleich zum unbeeinflussten P-TEFb (Abbildung 15). Somit kann die inhibitorische Wirkung von Hxm1 durch Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 CT aufgehoben werden. Brd4 CT scheint somit ein Aktivator von P-TEFb zu sein.

Stimulation der Kinaseaktivität durch Brd4 CT

Nachdem die CT-Domäne von Brd4 als Aktivator von inhibiertem P-TEFb identifiziert werden konnte, wurde nun der Einfluss der isolierten Domänen CT, BD1 und BD2 auf unbeeinflusstes P-TEFb im Kinaseassay analysiert. In Anwesenheit der Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4 konnte keine Steigerung der Phosphatgruppenübertragung beobachtet und daher kein stimulierender Einfluss auf P-TEFb durch BD1 oder BD2 sowie der Kontrolle mit GST nachgewiesen werden (Abbildung 16). Die Negativkontrolle in Abwesenheit von P-TEFb, bzw. in Anwesenheit von Flavopiridol, wies ein Hintergrundsignal von etwa 1% auf.

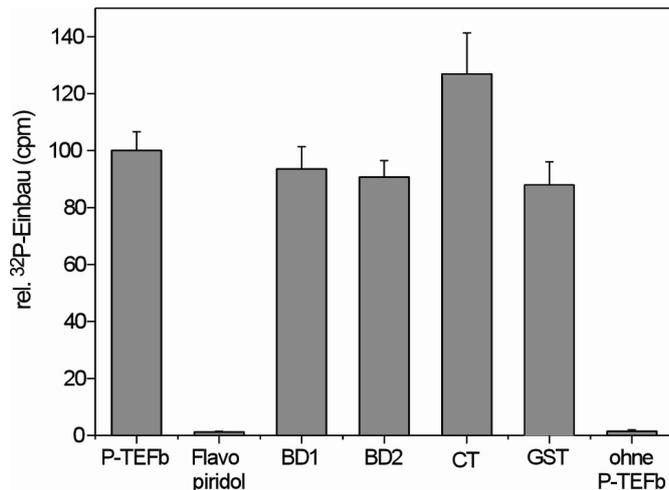


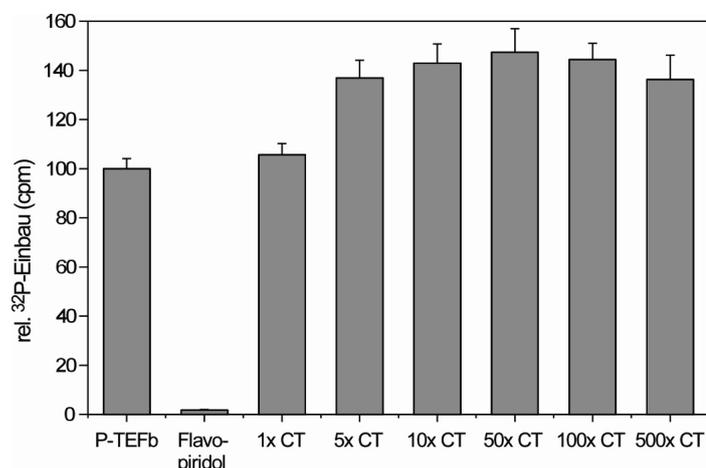
Abbildung 16: Einfluss von Brd4 auf die Kinaseaktivität von P-TEFb. Die Quantifizierung der Radioaktivität durch Übertragung der γ -³²P-Phosphatgruppen von 100 μ M ATP auf 100 μ M CTD-Substrat zeigten eine Steigerung der Kinaseaktivität von 0,1 μ M P-TEFb auf 127% in Anwesenheit von 10 μ M CT relativ zur unbeeinflussten Kinasereaktion (P-TEFb). BD1, BD2 und GST zeigten dagegen keine Steigerung der Kinaseaktivität. Die beiden Negativkontrollen mit Flavopiridol oder ohne Kinase zeigten ein Hintergrundsignal von 1% relativ zu P-TEFb. Gemessen wurde die Radioaktivität nach 15 min bei 30°C.

Dagegen konnte in Anwesenheit von CT eine Steigerung der relativen Kinaseaktivität auf 127% beobachtet werden, ähnlich der in Abbildung 14 dargestellten erhöhten Anzahl der übertragener Phosphatgruppen auf das GST-CTD-Substrat. Somit konnte neben der Aktivierung von Hxm1-inhibiertem P-TEFb durch Brd4 CT auch eine Stimulation der P-TEFb-Kinaseaktivität durch die C-terminale Domäne CT von Brd4 nachgewiesen werden (Abbildung 16).

Im oben beschriebenen Kinaseassay wurde CT bei einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt, resultierend in einem 100-fachen Überschuss im Vergleich zu P-TEFb. Um zu überprüfen, ob diese Konzentration einen maximalen Einfluss auf P-TEFb garantiert oder ob durch eine weitere Erhöhung der CT-Konzentration eine zusätzliche Steigerung der Aktivierung erreicht werden kann, wurde eine Konzentrationsreihe mit ansteigenden Konzentrationen CT erstellt. Getestet wurde ein CT-Konzentrationsbereich von 0,1 μ M (1:1 zu P-TEFb) bis 50 μ M (500-facher Überschuss; Abbildung 17).

Die erstellte Konzentrationsreihe zeigte eine Steigerung der Kinaseaktivität um ca. 40%, welche mit 0,5 μ M CT und 0,1 μ M P-TEFb erreicht wurde (Abbildung 16). Der durchgeführte Kinaseassay (Abbildung 16) zur Bestimmung des Einflusses der BDs und CT auf P-TEFb wurde mit 10 μ M demnach bei einer Konzentration durchgeführt, durch die eine maximale Aktivierung von P-TEFb durch CT gewährleistet wurde.

Abbildung 17: CT-Konzentrationsreihe zur Ermittlung der maximalen Aktivierung von P-TEFb. Bei Einsatz von ansteigenden Konzentrationen von CT zu 0,1 μ M P-TEFb zeigte sich eine optimale CT-Konzentration von 5 bis 10 μ M (50-100-fach über 0,1 μ M P-TEFb), wodurch die Kinaseaktivität um bis zu 47% (50x CT) gesteigert werden konnte. Dabei wurden 100 μ M GST-CTD für 15 min mit 100 μ M ATP bei 30°C inkubiert.



Die CT-Konzentrationsreihe ermöglichte zudem eine grobe Abschätzung der Dissoziationskonstante von P-TEFb und CT. Der 1:1-Einsatz von 0,1 μM P-TEFb und 0,1 μM CT zeigte bereits eine Steigerung der Phosphatgruppenübertragung von 6%. Ausgehend von 140% maximaler Übertragung bei $\geq 0,5 \mu\text{M}$ CT entspricht dies 15% der maximalen Übertragung. Unter der Annahme, dass der 1:1-Komplex einen K_d von 0,1 μM aufweisen würde, ergäbe sich eine 50%-ige Besetzung ($\text{Besetzung} = \frac{[c]}{[c] + K_d}$). Da eine 50%-ige Besetzung des Komplexes auch 50%-iger gesteigerter Phosphatgruppenübertragung entsprechen würde, jedoch nur 15% gesteigerte Phosphatgruppenübertragung quantifiziert wurde, scheint der tatsächliche K_d höher als 0,1 μM zu liegen. Die Annahme eines 1:2-Komplexes führt bei einem K_d von 0,1 μM zu einer Besetzung von 33%. Auch in diesem Fall läge der tatsächliche K_d über 0,1 μM . Bei einem spekulativen K_d von 1 μM ergäben sich Besetzungen von 9% (1:1-Komplex) bzw. 5% (1:2-Komplex). Somit kann aus der CT-Konzentrationsreihe ein K_d zwischen 0,1-1 μM abgeschätzt werden.

4.1.2 Vergleich des HIV-1 Tat-Proteins und der CT-Domäne von Brd4

Ebenso wie CT ist das HIV-1 Protein Tat in der Lage, den durch Bindung von Hxm1 inhibierten Zustand von P-TEFb aufzuheben und P-TEFb zu aktivieren (Fraldi et al., 2005; Schulte et al., 2005; Barboric et al., 2007). Dabei interagiert Tat im Komplex mit der TAR RNA mit CycT1 und aktiviert P-TEFb durch kompetitive Verdrängung von Hxm1 (Garber et al., 1998; Schulte et al., 2005; Barboric et al., 2007). Da sowohl Tat als auch die C-terminale Domäne (CT) von Brd4 P-TEFb aus dem inhibierten in den aktiven Zustand überführen und sich auch in ihrer Erscheinung als kleines Protein bzw. Domäne ähneln, wurde im Folgenden untersucht, ob beide vergleichbare Mechanismen der Aktivierung aufweisen.

Aktivierung von P-TEFb durch HIV-1 Tat und die TAR RNA

Der $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP-basierte Kinaseassay wurde im Folgenden zur Quantifizierung der Aktivierung von P-TEFb durch Tat eingesetzt, um den Einfluss des HIV-1 Proteins mit dem von CT auf P-TEFb vergleichen zu können (Abbildung 18). Wie zuvor für CT untersucht, wurde zunächst die Wirkung von Tat und TAR auf aktives P-TEFb quantifiziert. Tat erhöhte die Aktivität von P-TEFb um 16%, während TAR alleine keinen Einfluss auf P-TEFb zeigte. In Anwesenheit beider Komponenten wurde die Kinaseaktivität auf 129% gesteigert.

Die Inhibition durch Hxm1 konnte jedoch nur in Gegenwart beider Faktoren aufgehoben und 99% der ursprünglichen Aktivität wiederhergestellt werden (Abbildung 18). HIV-1 Tat kann somit die Inhibition durch Hxm1 aufheben, für eine effektive Aktivierung ist jedoch die Komplexbildung mit TAR RNA notwendig.

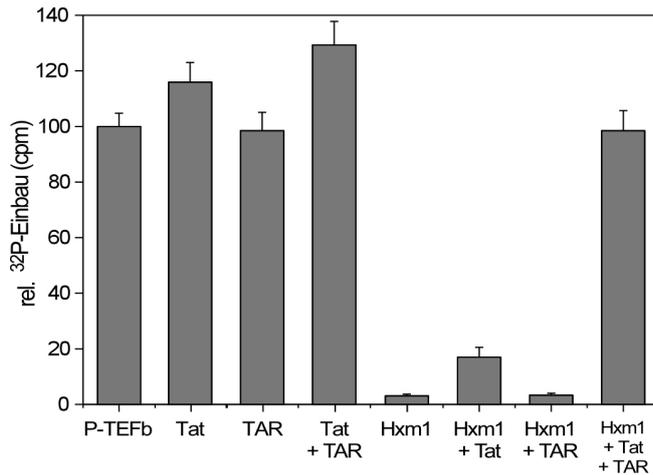


Abbildung 18: Einfluss von HIV-1 Tat und der TAR RNA auf die Kinaseaktivität von P-TEFb. In Gegenwart von 10 μ M Tat und 100 μ M ATP erhöht sich die Aktivität von 0,1 μ M P-TEFb um 16% über das unbeeinflusste Maß. Dabei wurden 100 μ M GST-CTD-Substrat mit 9 Heptaden für 15 min bei 30°C inkubiert. 10 μ M TAR RNA hat keinen Einfluss auf P-TEFb, gemeinsam mit Tat, wird die Aktivität der Kinase jedoch auf 129% erhöht. Nach der Inhibition von P-TEFb durch 2 μ M Hxm1 auf 3% Aktivität konnte durch Zugabe von Tat lediglich 17% der Aktivität wiederhergestellt werden, während die TAR RNA keinen Effekt zeigte. Die Aktivität von P-TEFb konnte durch Wirkung beider Faktoren wiederhergestellt werden.

Interaktionsstudien zur potentiellen Bindung von CT mit RNAs

Der Einfluss von HIV-1 Tat auf P-TEFb scheint durchaus vergleichbar zur Aktivierung durch die CT-Domäne von Brd4 zu sein. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz in EIAV oder HIV Tat mit CT weist in einigen Motiven überraschende Ähnlichkeiten auf (siehe Abbildung 19, farbliche Hervorhebungen). Das längste dieser Motive umfasst neun hauptsächlich positiv geladene Reste (49-78, Nummerierung aus HIV-1 Tat), welches als argininreiches Motiv (ARM) die Interaktion von Tat mit der ersten Cyclin-Box von CycT1 und der TAR RNA Haarnadelschleife vermittelt (Anand et al., 2008). C-terminal hierzu befindet sich ein Dileucinmotiv (LL), das im ternären CycT1-Tat-TAR Komplex aus EIAV über hydrophobe Interaktionen mit CycT1 interagiert (Anand et al., 2008). In HIV-1 Tat ist dieses Dileucin als SL erhalten.

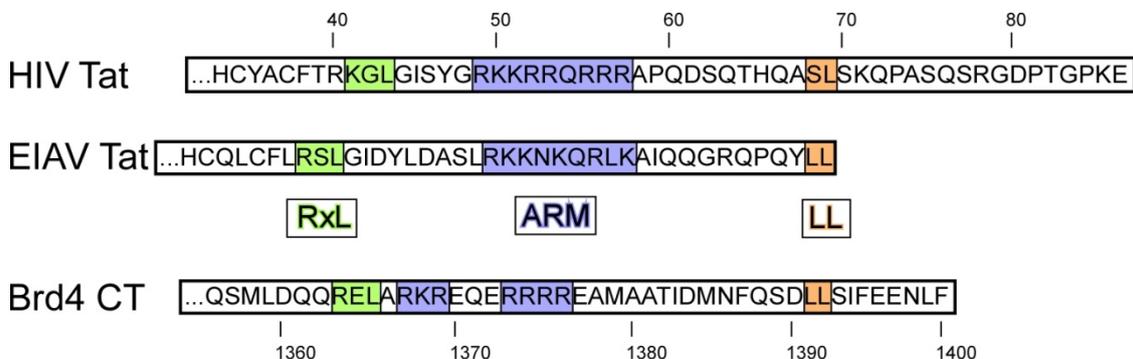


Abbildung 19: Sequenzvergleich von Motiven in HIV Tat und EIAV Tat und Brd4 CT. Überraschende Ähnlichkeiten ergeben sich in der Abfolge für ein RxL/KxL-Motiv, ein argininreiches Motiv (ARM) und ein C-terminales Dileucinmotiv (LL).

N-terminal des ARM-Motives befindet sich eine RxL-Sequenz, welche als Cyclinbindungs-motiv in Kinasesubstraten diskutiert wird (Schulman et al., 1998). In HIV Tat tritt dieses Motiv (im Gegensatz zu EIAV) als KxL-Motiv auf (Abbildung 19).

Interessanterweise enthält die CT-Domäne von Brd4 sowohl ein potentielles RxL-Motiv (1363-1365) und ein Dileucin-Motiv (1391-1392), als auch zwei positiv geladene Bereiche (1367-1369 und 1372-1375), die Ähnlichkeiten zu dem ARM von Tat aufweisen. Da solch ein basischer Bereich in Analogie zu Tat die Interaktion zu Nukleinsäuren vermitteln könnte,

wurde überprüft, ob CT mit den zwei in P-TEFb Komplexen auftretenden RNAs 7SK und TAR interagiert.

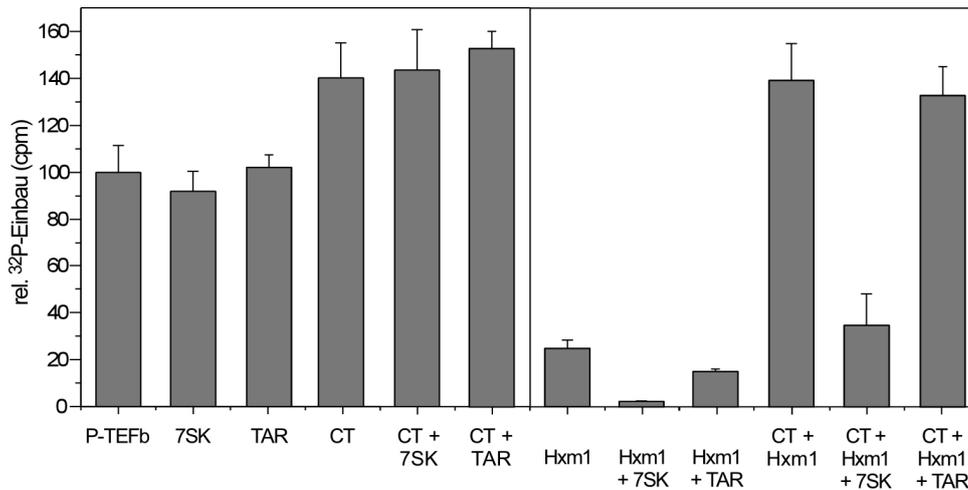


Abbildung 20: Einfluss der RNAs 7SK und TAR auf Brd4 CT. A) Weder P-TEFb, noch der P-TEFb:CT Komplex wurde durch 7SK snRNA oder der TAR RNA signifikant in seiner Aktivität beeinflusst. Die P-TEFb-Inhibitoren Hxm1fl und 7SK inhibierten die Kinaseaktivität, während Hxm1:TAR eine Inhibition auf 15% Aktivität erreichten. CT konnte die Wirkung von Hxm1/7SK auf 33% umkehren, die Inhibition von P-TEFb durch Hxm1:TAR wurde vollständig durch CT aufgehoben. Gemessen wurde die Aktivität von 0,1 μ M P-TEFb in Anwesenheit von 100 μ M GST-CTD-Substrat und 100 μ M ATP bei Zugabe von 10 μ M Tat, TAR oder CT und gegebenenfalls 2 μ M Hxm1. Die Reaktion wurde nach 15 min bei 30°C quantifiziert.

In Anwesenheit der RNAs 7SK oder TAR konnte keine signifikante Steigerung der Aktivierung von P-TEFb erkannt werden, auch in Gegenwart von CT und den RNAs konnte keine Steigerung zusätzlich zu der durch CT festgestellt werden (Abbildung 20 linke Seite). Die Zunahme des Phosphatgruppentransfers lag bei 3-4% und war damit nicht signifikant im Vergleich zur Standardabweichung der Mittelwerte von 5-8%.

Die Interaktion von Hxm1 und der 7SK snRNA wird über ein basisches Motiv vermittelt, welches dem Konstrukt Hxm1 (200-359) fehlt. Daher wurden für das folgende Experiment nun Vollängen-Hxm1 eingesetzt. Dieses Konstrukt erreichte jedoch nur eine Inhibition der Phosphatgruppenübertragung auf 22% des Ausgangswerts, erst in Anwesenheit der 7SK snRNA konnte eine vollständige Inhibition erreicht werden. In Gegenwart der TAR RNA erzielte Hxm1 nun eine Inhibition auf 15% (Abbildung 20, rechte Seite). Wurden diese Komplexe nun mit CT versetzt, konnten im Falle von Hxm1/7SK 35% der Kinaseaktivität wiederhergestellt werden, während Hxm1/TAR/CT eine vergleichbare Kinaseaktivität von 136% zeigten wie in Gegenwart von CT (Abbildung 20). In dieser Versuchsreihe konnte demnach keine stimulatorische Wirkung der RNAs 7SK und TAR auf die Aktivierung von P-TEFb durch CT festgestellt werden.

Mutationsstudien an CT zur Identifizierung wichtiger Aktivierungselemente

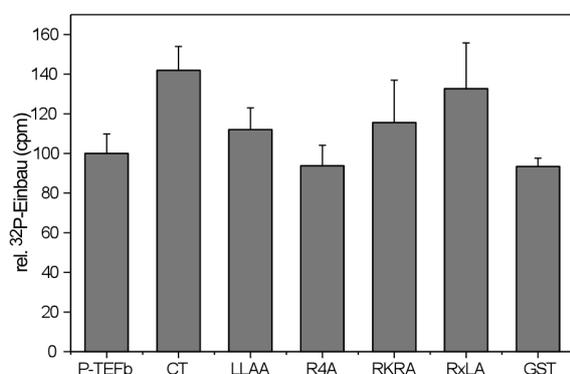
Die beschriebenen Sequenzmotive in HIV und EIAV Tat (Abbildung 19) spielen nicht nur bei der Bindung der TAR RNA, sondern auch bei der Interaktion mit CycT1 eine entscheidende stimulatorische Rolle. Die Tatsache, dass diese Sequenzen eine möglicherweise konvergente Entsprechung in CT haben, lässt vermuten, dass diese Elemente auch in CT eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit P-TEFb spielen könnten. Eine Mutation

dieser potentiell wichtigen Sequenzmotive in CT sollte demnach zu einer Beeinflussung der Aktivierung von P-TEFb führen. Zur experimentellen Überprüfung dieser Hypothese wurden vier Aminosäurepunktmutanten erstellt, in denen die potentiell wichtigen Reste durch Alanin ersetzt wurden. So wurden das Dileucin (1391-1392) und das RxL-Motiv (1363-1365) durch Alaninmutation zu einer CT L1391A/L1392A-Mutante (im Folgenden als LLAA bezeichnet) bzw. RxLA-Mutante (CT R1363A/L1365A) verändert. Zudem wurden die basischen Bereiche 1367-1369 und 1373-1376 in den Mutanten RKRA (CT R1367A/K1368A/R1369A) und R4A (CT R1373A/R1374A/R1375A/R1376A) modifiziert.

Der Einfluss der CT-Mutanten auf die Kinaseaktivität von P-TEFb wurde im Folgenden untersucht (Abbildung 21 A). Es zeigte sich, dass keine der Mutanten eine Aktivierung von P-TEFb um 42%, wie sie Wildtyp CT erreicht, vermitteln konnte. LLAA und RKRA erreichten mit 12-16% etwa die Hälfte des maximalen Effekts im Vergleich zum Wildtyp CT. Der stimulatorische Effekt von Brd4 CT auf P-TEFb geht bei der R4A-Mutante vollständig verloren, was für eine wichtige Funktion dieser Reste spricht. Keine Wirkung im Vergleich zu Wildtyp CT zeigte die RxLA-Mutante mit einer konstant erhöhten Kinaseaktivität von 133%.

Die Effekte der Mutationen der auffälligen Sequenzmotive in CT zeigten sich deutlich bei der Zugabe zu Hxm1 (200-359)-inhibiertem P-TEFb. Hxm1 reduzierte die Kinaseaktivität von Cdk9 auf 4%, CT stellte 66% der Aktivität von P-TEFb wieder her (Abbildung 21 B). Jedoch war lediglich die RxLA-Form der Mutanten in der Lage, den inhibierten Zustand von P-TEFb partiell aufzuheben. Sie konnte 18% der Aktivität wiederherstellen. Die drei übrigen Mutanten konnten die Inhibition von P-TEFb durch Hxm1 nicht beeinflussen (Abbildung 21 B).

A



B

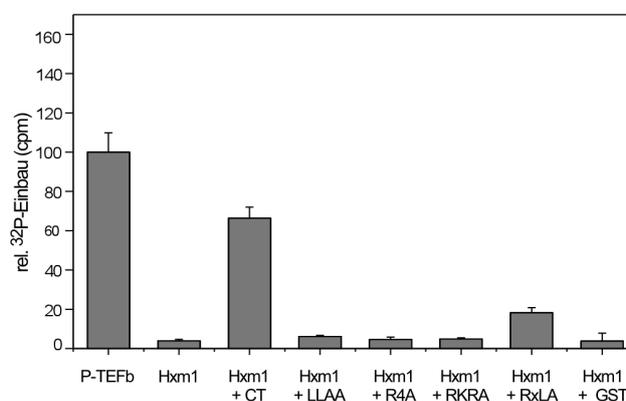


Abbildung 21: Einfluss von Mutationen der potentiellen Interaktionsmotiven in CT auf die Aktivierung von P-TEFb. A) In Anwesenheit von 10 μ M CT und 100 μ M ATP konnte eine Steigerung der Phosphatgruppenübertragung von 0,1 μ M P-TEFb auf 100 μ M GST-CTD-Substrat um 42% gemessen werden. Bei Zugabe der CT-Mutanten (10 μ M) für 15 min bei 30°C wurde dieser Effekt jedoch reduziert, LLAA und RKRA zeigten nur noch 12-16% Aktivierung, während R4A keine Veränderung der Kinaseaktivität im Vergleich zu unbeeinflusstem P-TEFb aufwies. RxLA-CT erreichte 33% Steigerung der Kinaseaktivität. B) Nach der Inhibition durch Hxm1 (200-359) wurden durch CT 66% der Kinaseaktivität wiederhergestellt. Die CT-Mutanten LLAA, R4A und RKRA konnten dagegen keine Gegenreaktion zur Inhibition von Hxm1 auslösen, RxLA stellte 18% des Phosphatgruppen-transfers wieder her.

Die beobachteten Effekte der CT-Mutanten auf die Aktivierung von P-TEFb, könnten auf eine Beeinträchtigung der Interaktion von CT mit Cdk9, CycT1, Hxm1 oder dem CTD-Substrat hindeuten. Jedoch weisen diese Ergebnisse nicht zwangswise auf eine direkte Beteiligung

der entsprechenden Sequenzen an der Bindung hin. Vielmehr könnten die eingeführten Mutationen Sekundärstrukturen verändert oder gar zerstört haben, welche die Interaktion mit P-TEFb ermöglichen. Eine solche Beeinträchtigung von CT durch die Aminosäuremutationen sollte im Folgenden durch die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile der CT-Varianten mittels Circular-Dichroismus (CD) überprüft werden. Hierfür wurden CD-Spektren der CT-Proben im Bereich von 190-260 nm aufgenommen und die mittlere molare Elliptizität pro Rest θ in Abhängigkeit der Wellenlänge in Abbildung 22 aufgetragen. Aus den Spektren wurde eine Abschätzung der Sekundärstrukturanteile unter Verwendung des Programms Dichroweb ermittelt (Whitmore und Wallace, 2008).

Zunächst wurden die CD-Spektren des Wildtyp CTs (1351-1400) und CT-W (W1338-1400) verglichen, um sicherzustellen, dass das verlängerte CT-W trotz seiner zusätzlichen 14 Aminosäuren keine deutlich veränderte Sekundärstruktur aufweist (Abbildung 22 A und C). Beide Spektren wiesen große Übereinstimmungen auf, und die Auswertung der Spektren hinsichtlich der Sekundärstruktur der Proteine präsentierte für beide Proteine eine weitestgehend von α -Helices dominierte Sekundärstruktur. Durch die Verlängerung des Konstrukts CT zu CT-W wurde der relative Anteil ungeordneter Bereiche der Faltung verringert, dafür trat eine Erhöhung der α -helikalen und in Schleifen organisierten Bereiche auf. Die Vergrößerung des Fragments von 50 auf 63 Aminosäuren scheint somit eine Stabilisierung der Sekundärstrukturelemente von CT zu bewirken.

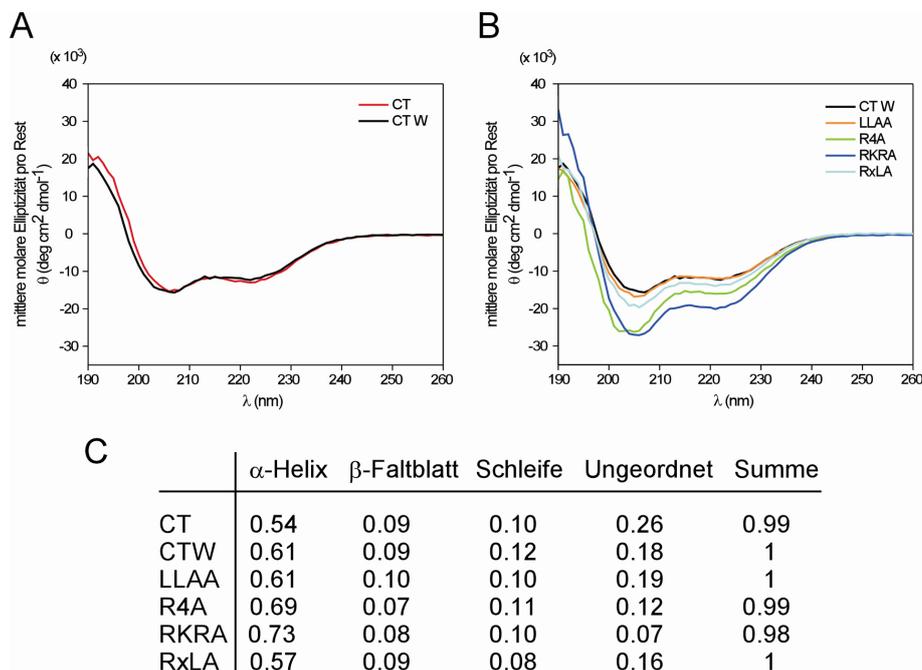


Abbildung 22: CD-spektroskopische Bestimmung der Sekundärstruktur der verschiedenen CT Formen. A) Die CD-Spektren von 5 μ M Wildtyp CT und CT-W in 5 mM KP_i -Puffer, pH 7,5, wiesen keine deutlichen Abweichungen voneinander auf und zeigten eine mittlere molare Elliptizität pro Rest zwischen -15 000 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ bei 205 nm und 20 000 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ bei 190 nm an. B) Der Vergleich der CD-Spektren von 5 μ M CT-W sowie der vier erstellten Mutanten LLAA, R4A, RKRA und RxLA zeigten deutliche Unterschiede der Spektren von R4A und RKRA bei 205 nm, während die anderen Mutanten ähnliche Spektren zu CT-W aufwiesen. C) Die Auswertung der unter A und B gezeigten CD-Spektren durch das Programm Dichroweb (Whitmore und Wallace, 2008) ergab eine hauptsächlich α -helikale Faltung der CT-Proteine von 54-73%, nur ein geringer Anteil von 7-26% lag ungeordnet vor. Der Vergleich der Ergebnisse deutet auf eine Verstärkung der α -helikalen Faltung in den Mutanten R4A und RKRA hin, während die anderen Mutanten nur geringfügig von Wildtyp CT abweichen.

Die Mutanten LLAA und RxLA zeigten ebenfalls keine auffällige Veränderung der Sekundärstruktur gegenüber dem CT-W-Konstrukt (Abbildung 22 B und C). Mit 61% und 57% α -helikaler Strukturen bestehen auch sie hauptsächlich aus α -Helices, während nur ein geringer Anteil des Proteins (19% bzw. 16%) ungeordnet vorliegt. Im Gegensatz dazu offenbaren die Mutanten R4A und RKRA, in denen die basischen Bereiche 1367-1369 und 1373-1376 in Alanine verändert wurden, eine deutliche Abnahme der ungeordneten Bereiche zugunsten von einer erhöhten α -helikalen Organisation (Abbildung 22 C).

Insgesamt konnte über diese CD-spektroskopischen Messungen nachgewiesen werden, dass die eingeführten Mutationen an CT nicht zu einer Zerstörung der Sekundärstruktur der Proteine führten, da diese entweder nicht beeinträchtigt oder vielmehr erweitert wurde. Die deutliche Reduktion der Aktivierung von P-TEFb durch die CT-Mutanten können daher nicht auf eine strukturelle Veränderung der CT-Mutanten zurückgeführt werden.

4.1.3 Zeitaufgelöste Analyse der Aktivierung von P-TEFb durch Brd4 CT

In den bisher gezeigten Versuchsergebnissen ist deutlich geworden, dass Brd4 durch einen bislang unbekanntem Mechanismus, vermittelt über seine CT-Domäne, die Aktivität des Transkriptionsfaktors P-TEFb stimuliert. Dieser Aktivitätserhöhung könnten zwei alternative Mechanismen zugrunde liegen:

Einerseits könnte CT direkt die Phosphatgruppenübertragung auf das Substrat CTD durch P-TEFb stimulieren. Die Menge der übertragbaren Phosphatgruppen wäre dabei durch die Anzahl der Heptadwiederholungen des CTD-Konstrukts limitiert, da jeweils nur Ser2 phosphoryliert werden kann. Die Reaktion würde jedoch schneller den Endpunkt durch vollständige Phosphorylierung der vorhandenen Ser2 in der CTD erreichen.

Andererseits könnte durch CT die Substratspezifität von P-TEFb für CTD verändert werden und dadurch indirekt die Geschwindigkeit der Phosphatgruppenübertragung gesteigert werden, analog zu einem Mechanismus beschrieben für HIV-1 Tat (Zhou et al., 2000). Im Falle von Tat wird die Spezifität von P-TEFb für Ser2 auf Ser2/Ser5 erweitert. Dies führt zu einer apparenten Erhöhung der CTD-Substratkonzentration durch Verdopplung der Anzahl phosphorylierbarer Stellen. Während unbeeinflusstes P-TEFb bei annähernd vollständiger Phosphorylierung des Substrates eine verlangsamte Phosphatgruppenübertragung zeigen würde, würde sich die Reaktion von P-TEFb:CT aufgrund der apparent erhöhten Substratkonzentration noch nicht dem Endpunkt der Reaktion, der vollständigen Phosphorylierung von Ser2 und Ser5, nähern und eine apparent höhere Übertragungsrate aufweisen.

Im Folgenden wurde zunächst die Frage der Phosphorylierungskinetik durch zeitaufgelöste Beobachtungen der Phosphatgruppenübertragung auf GST-CTD durch P-TEFb und P-TEFB-CT untersucht.

Zeitaufgelöste Analyse der Kinasereaktion von P-TEFb per SDS-PAGE

Zur Untersuchung der angeführten CT-vermittelten Mechanismen, wurde ein zeitaufgelöster Verlauf der Phosphorylierungsreaktion des GST-CTD-Substrats durchgeführt. Zehn Kinase-

reaktionsansätze wurden in Anwesenheit von 10 μM CT angesetzt, die Kinaseaktivität zu definierten Zeitpunkten durch Zugabe von 50 mM EDTA beendet und der Phosphorylierungszustand von GST-CTD in einem 20%-igen SDS-PAGE-Gel analysiert (Abbildung 23 A und B).

In Abbildung 23 A ist die Kinasereaktion von P-TEFb in Abwesenheit von CT dargestellt. Zum Vergleich der Bandenhöhe wurde in der ersten Spur GST-CTD ohne Kinase oder ATP aufgetragen (Spur Sub). Das GST-Substrat aus neun Heptadwiederholungen mit drei C- und N-terminalen Lysinen lief bei einem Molekulargewicht von ca. 33 kDa in der SDS-PAGE. Die Bande bei 27 kDa lässt jedoch auf leichte GST-Verunreinigungen schließen. In den folgenden Spuren der Proben bei $t = 0$ min bis zu $t = 360$ min konnte eine Verschiebung der Bandenhöhe mit der Zeit zugunsten verkürzter Laufweiten im Gel beobachtet werden (Abbildung 23 A). Unter den gewählten Versuchsbedingungen war die Reaktion nach ca. 180 min abgeschlossen, da sich das gesamte Substrat zu einem Produkt mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 36 kDa umgesetzt hatte.

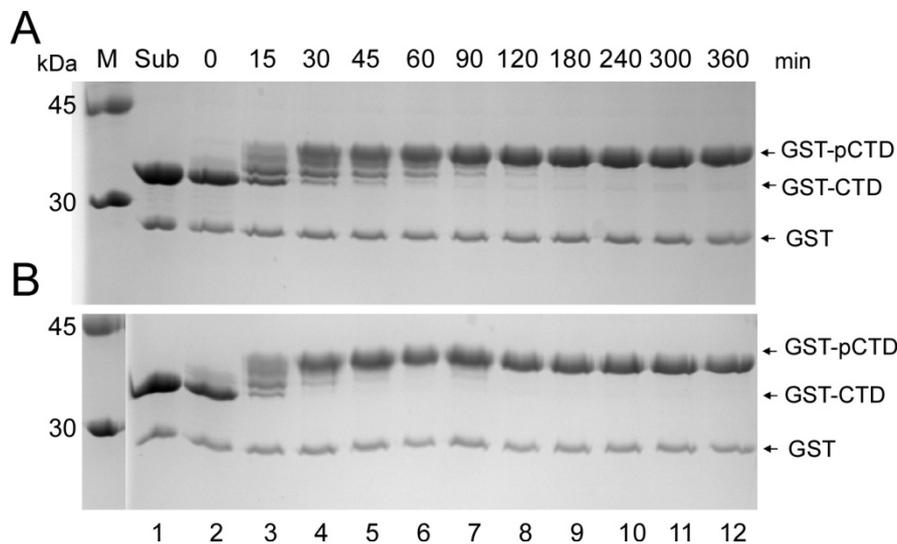


Abbildung 23: SDS-PAGE der zeitaufgelösten Kinasereaktionen von P-TEFb. A) Die Reaktion von 0,1 μM P-TEFb mit 10 μM GST-CTD und 400 μM ATP zeigte ausgehend von der Bande des Substrats bereits nach 15 min eine Verschiebung der erkennbaren Banden zu geringeren Laufweiten. Nach 180 min war nur noch eine Bande bei etwa 36 kDa erkennbar, die den Endpunkt der Reaktion markierte. B) Bei Zugabe von 10 μM CT zu dem Reaktionsansatz verschob sich die Bande des GST-Substrats deutlich schneller und erreichte bereits nach etwa 60 min den Endpunkt der Reaktion bei 36 kDa.

Bei einem Zusatz von CT zu dem Reaktionsansatz konnte ebenfalls ein Endpunkt der Reaktion bei einem Molekulargewicht von etwa 36 kDa erkannt werden (Abbildung 23 B). Dieser Endpunkt wurde aber bereits nach etwa 60 min erreicht. Da bei einer Veränderung der Substratspezifität von P-TEFb durch CT ein Produkt mit höherem Molekulargewicht zu erwarten wäre, dieses aber nicht auftrat, unterstützen die Ergebnisse einer direkten Stimulation der P-TEFb-Aktivität ohne Beeinflussung der Anzahl phosphorylierbarer Stellen der CTD.

Zeitaufgelöste Messung im Filterbindungsassay

Das Molekulargewicht und der Phosphorylierungszustand des Produkts am Endpunkt der Reaktion konnte in dem SDS-PAGE-basierten Kinaseassay nur abgeschätzt werden. Eine

genaue Quantifizierung des Zeitverlaufs der übertragenen Phosphatgruppen sollte über den bereits unter 4.1.1 beschriebenen Filterbindungsassay unter Verwendung von radioaktiv-markiertem γ - ^{32}P -ATP erfolgen. Hierfür wurden zehn Ansätze über einen Zeitraum von 15 min bis 360 min mit γ - ^{32}P -ATP bei 30°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Kinasereaktionen gestoppt und die Radioaktivität der Proben quantifiziert. Dabei wurden parallel sowohl die unbeeinflusste Reaktion als auch die Reaktion in Gegenwart von 10 μM CT untersucht.

In Abbildung 24 A sind die Radioaktivitäten der beiden Reaktionen in cpm (engl.: *counts per minute*) gegen die Zeit aufgetragen. Diese zeigten für P-TEFb (schwarze Vierecke) als und P-TEFb + CT (rote Punkte) einen hyperbolischen Kurvenverlauf, der zu einem Endwert von 80 000 cpm strebte. Der Vergleich der Kurven machte deutlich, dass beide Reaktionen einen identischen Endpunkt besitzen, jedoch in Abwesenheit von CT die Produktbildung langsamer ist und den Endpunkt erst nach etwa fünf Stunden erreicht. Die durch CT-stimulierte Reaktionskurve ist schon nach zwei bis drei Stunden beendet, wie es auch im SDS-PAGE-Gel der Reaktionen zu beobachten war (Abbildung 23).

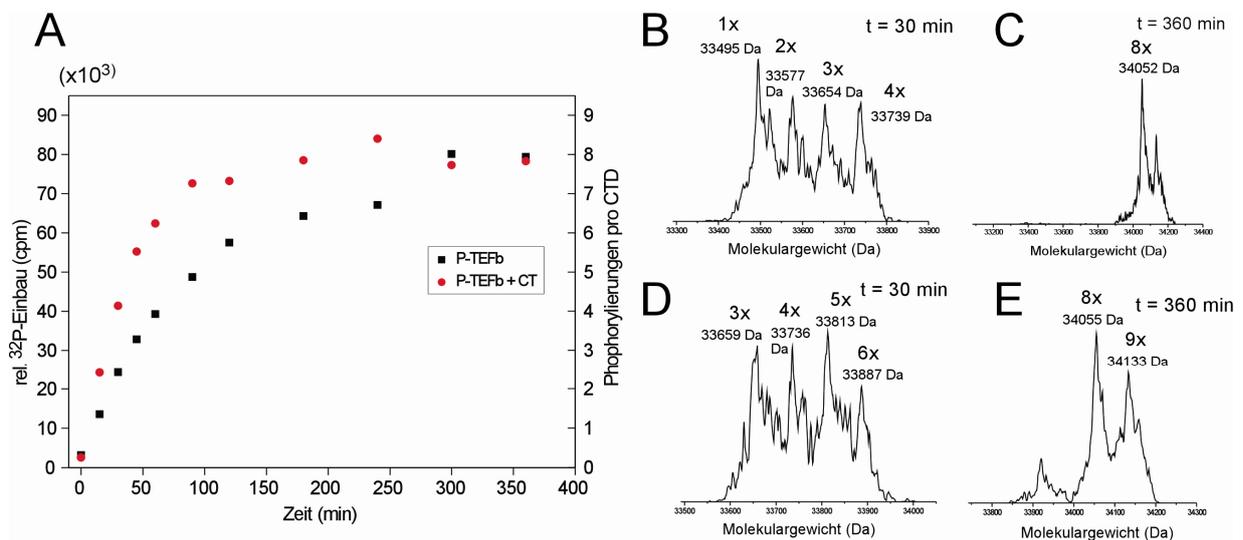


Abbildung 24: Bestimmung des maximalen Phosphorylierungszustands des GST-CTD-Substrats. A) Die zeitabhängige Messung der Kinasereaktion von 0,1 μM P-TEFb mit 10 μM GST-CTD-Substrat (9 Heptade mit terminalen Lysinen) im Filterbindungsassay bei 30°C unter Verwendung von 400 μM γ - ^{32}P -ATP zeigte einen Anstieg der übertragenen Phosphatgruppen durch P-TEFb auf einen Endpunkt von 80 000 cpm. B) Die massenspektrometrische Untersuchung eines nicht-radioaktiven Ansatzes von P-TEFb, ATP und Substrat nach 30 min Reaktionszeit zeigte 1-4 Phosphorylierungen des Substrats. C) Nach 360 min konnte 8 übertragenen Phosphatgruppen als Endpunkt der Reaktion nachgewiesen werden. D) In Anwesenheit von 10 μM CT wurden nach 30 min 3-6 Phosphatgruppen auf das GST-CTD-Substrat übertragen. E) Nach 360 min wurden 8-9 Phosphorylierungen des Substrats als Endpunkt ermittelt.

Zur Bestimmung der maximalen Anzahl an übertragenen Phosphatgruppen wurde der zeit-aufgelöste Kinaseassay auch mit nicht-radioaktivem ATP durchgeführt und die entstehenden phosphorylierten Produkte mittels Massenspektrometrie analysiert. Da das verwendete GST-CTD-Konstrukt neun Heptadwiederholungen enthielt, jedoch die drei N- und C-terminal-liegenden Reste zu Lysinen mutiert wurden (siehe 4.1.1), liegen acht phosphorylierbare Ser2-Reste im Konstrukt vor. Bei einer Verschiebung der Substratspezifität von P-TEFb durch Bindung von CT auf Ser2 und Ser5 könnten bis zu 16 Phosphorylierungen möglich

und nachweisbar sein. Bei der Massenanalyse der Kinasereaktionen konnte auch hier eine Steigerung der Kinaseaktivität von P-TEFb in Gegenwart von CT beobachtet werden. So wurden zum Zeitpunkt $t = 30$ min 1 bis 4 Phosphatgruppen von unbeeinflusstem P-TEFb auf das Substrat transferiert (Abbildung 24 B), in Anwesenheit von CT wurden dagegen zum selben Zeitpunkt 3 bis 6 Phosphatgruppen übertragen (Abbildung 24 D). Der Endpunkt der Reaktion lag in beiden Fällen bei acht übertragenen Phosphatgruppen (Abbildung 24 C, E) und ist damit im Einklang mit den Ergebnissen des Filterbindungsassays (Abbildung 24 A). In Gegenwart von CT konnten in Massenspektren einzelner Ansätze, u.a. bei $t = 360$ min, sogar neunfach-phosphorylierte Substrate zu einem geringen Anteil nachgewiesen werden (Abbildung 24 E). Obwohl die Endpunkte in Anwesenheit und Abwesenheit von CT übereinstimmen, deutet dies auf einzelne Heptade hin, in denen zwei Serine phosphoryliert werden konnten. Dies weist jedoch nicht auf eine generelle Verschiebung der Spezifität von P-TEFb durch CT hin. Alternativ könnte dieses eine artifizielle Phosphorylierung von GST belegen.

Da die massenspektrometrische Untersuchung der Kinaseansätze eine maximale Übertragung von mehrheitlich acht Phosphatgruppen zeigte, konnten die im Filterbindungsversuch gemessenen 80 000 cpm am Endpunkt zu den acht Phosphorylierungen in ein Verhältnis von 10 000 cpm pro übertragener Phosphatgruppe gesetzt werden. Unter dieser Annahme wurde die spezifische Aktivität des unbeeinflussten oder durch CT-aktivierten P-TEFbs bestimmt. Zum Zeitpunkt $t = 30$ min, an welchem die Steigungen der Kurven maximal voneinander abwichen, belief sich die spezifische Aktivität von P-TEFb auf $113 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ Enzym. In Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ CT wurde die spezifische Aktivität von P-TEFb dagegen auf $193 \text{ pmol} \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ Enzym berechnet und ist damit um 70% gegenüber der unbeeinflussten Form erhöht.

Zusammengefasst deuten Ergebnisse nicht auf eine Verschiebung der Spezifität von P-TEFb durch die Interaktion mit CT hin, sondern legen vielmehr eine Beschleunigung der Phosphatgruppenübertragung durch P-TEFb in Anwesenheit von CT nahe.

4.1.4 Analyse der Interaktion von Brd4 CT mit P-TEFb

Nachdem in den beschriebenen Kinaseassays einerseits eine Stimulation der Aktivität von P-TEFb sowie eine Aktivierung von P-TEFb aus dem inhibierten Zustand deutlich geworden war, stellte sich die Frage, mit welchen Regionen von P-TEFb CT interagiert. Diesbezüglich wurden in der Vergangenheit widersprüchliche Beobachtungen gemacht: Einerseits wurde eine direkte Interaktion von Brd4 BDs mit CycT1 beschrieben (Jang et al., 2005). Andererseits wurde eine Bindung von CT sowohl an CycT1 als auch an Cdk9 nachgewiesen (Bisgrove et al., 2007). Da in dieser veröffentlichten Studie auch eine Beeinträchtigung der HIV-vermittelten Transaktivierung durch Tat aufgezeigt wurde und Hxm1 und Brd4 stets exklusiv in unterschiedlichen P-TEFb Komplexen (inaktiver 7SK snRNP- bzw. aktiver Komplex) auftreten, könnte CT wie auch Hxm1 und HIV-1 Tat an die Cyclin-Boxen von CycT1 binden. In diesem Fall würden diese drei P-TEFb-Regulatoren miteinander um die Bindung an CycT1 konkurrieren und somit die Formierung eines Heterokomplexes ausschließen.

Interaktion von CT mit P-TEFb

Da die Aktivierung von P-TEFb durch CT eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen nahelegt, wurde eine mögliche Wechselwirkung mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) in Zusammenarbeit mit Dr. Nadine Czudnochowski näher untersucht. Da P-TEFb sowohl sehr niedrige Ausbeuten als auch eine geringe Stabilität aufwies, konnte P-TEFb nur in einer Konzentration von 8 μM in der Zelle eingesetzt werden. Dem Ansatz wurde 1 mM ADPNHP als nicht-hydrolysierbares ATP-Analog zugegeben, um die Kinase zu stabilisieren. Abbildung 25 zeigt das ITC-Experiment mit den aufgenommenen und integrierten Wärmetönungen. Obwohl die geringe Stabilität und Konzentration des Proteins während der Messung zu störenden Ausschlägen gerade zum Ende der Messung führte, konnte die Messung hinsichtlich der thermodynamischen Parameter mit hinreichender Genauigkeit ausgewertet werden (Abbildung 25 C, sowie in detaillierter Form im Anhang in Tabelle 5 aufgelistet).

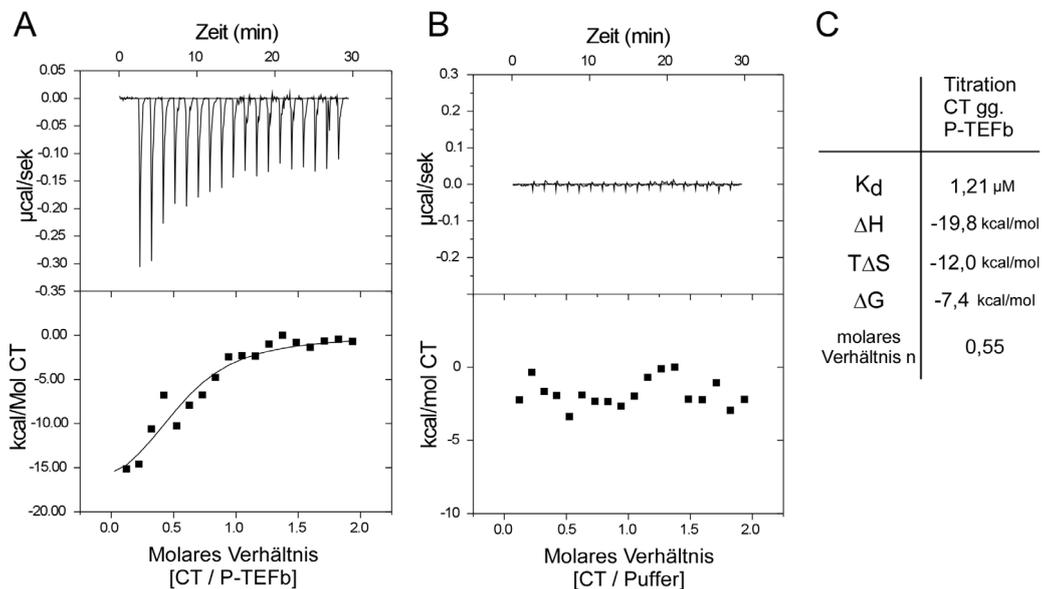


Abbildung 25: ITC-Messung zur Bindung von CT an P-TEFb. A) Die ITC-Titration von 80 μM CT gegen 8 μM P-TEFb in Gegenwart von 1 mM ADPNHP bei 15°C zeigte deutliche Wärmetönungsausschläge. B) Kontroll-ITC der Titration von 80 μM CT in 50 mM HEPES, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5% Glycerin, 1 mM MgCl_2 , 5 mM $\beta\text{-ME}$. C) Die thermodynamischen Parameter der Reaktion zeigen eine Änderung der Entropie von 12,0 kcal/mol und einem ΔG -Wert von -7,4 kcal/mol an. Die Affinität von CT zu P-TEFb wurde zu 1,21 μM bei einer Stöchiometrie des Komplexes von 0,55 bestimmt.

Bei der Titration von CT zu P-TEFb (Abbildung 25 A) wurden deutliche Wärmetönungsausschläge von bis zu 0,3 $\mu\text{cal}/\text{sek}$ registriert, welche in der Kontrolltitration von CT gegen Puffer nicht auftraten (Abbildung 25 B). Somit konnte eine Bindung zwischen CT und P-TEFb identifiziert werden. Dabei wurde die Änderung der Enthalpie der Reaktion (ΔH) auf -19,8 kcal/mol ermittelt, die den exothermen Charakter der Bindung anzeigt. Die Änderung der freien Gibbschen Energie ΔG ergab sich zu -7,4 kcal/mol. Die Dissoziationskonstante K_d der Bindung von CT und P-TEFb wurde auf 1,2 μM bestimmt und indiziert eine mittelstarke Bindung. Diese Werte sind jedoch aufgrund der Präzipitation von P-TEFb während der Reaktion nur als Abschätzungen zu betrachten, da die Fehlerabweichung der nicht-linearen Kurvenanpassung bis zu 50% des eigentlichen Wertes ausmachen. Trotzdem konnte auf

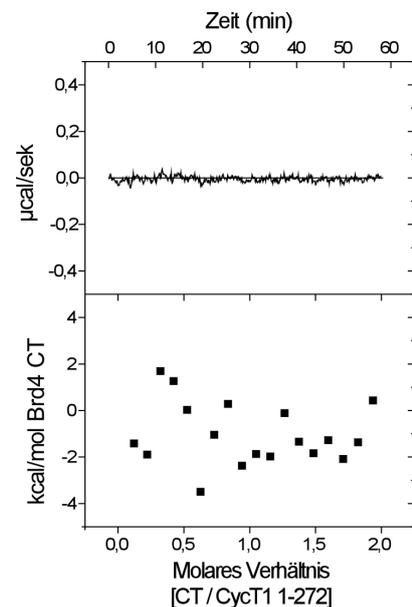
diese Weise gezeigt werden, dass CT und P-TEFb direkt miteinander interagieren. Als Stöchiometrie der Bindung wurde ein molares Verhältnis der Proteine zueinander von 0,55 ermittelt, was einer Bindung von zwei Molekülen CT an P-TEFb entspräche. Aufgrund einer möglichen Präzipitation von P-TEFb während der Messung könnte jedoch auch eine 1:1-Bindung vorliegen, die durch die tatsächlich geringere Konzentration des vorliegenden P-TEFbs verfälscht wurde.

Interaktion von CT mit CycT1

Nachdem die Interaktion von CT mit P-TEFb nachgewiesen wurde, war nun zu klären, ob diese Bindung über CycT1, Cdk9 oder über beide Proteinkomponenten gemeinsam vermittelt wird. Da aktives Cdk9 (pT186) nicht stabil isoliert werden kann (Czudnochowski, 2009), wurde im Rahmen dieser Arbeit die potentielle Assoziation von CT mit CycT1 (1-272) und (321-566, Czudnochowski, 2009) analysiert.

Es konnte jedoch mittels ITC keine Interaktion zwischen CT und CycT1 (1-272) und (321-566) beobachtet werden (dargestellt in Abbildung 26). Da zuvor eine Bindung von CT an den P-TEFb Komplex beschrieben wurde, CT jedoch nicht mit CycT1 interagiert, scheint die Bindung von CT die Gegenwart von Cdk9 zu benötigen.

Abbildung 26: ITC-Messung von CT und CycT1. Bei der Titration von 380 μM CT gegen 38 μM CycT1 (1-272) bei 15°C konnte keine Wärmetönung und damit keine Interaktion bei der Titration aufgezeichnet werden. Die Titration wurde in 50 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM TCEP durchgeführt.



Vergleich der Verdrängung von Hxm1 durch Tat und CT

Da Brd4 und Hxm1 nie gemeinsam im Komplex mit P-TEFb gefunden werden, könnten diese Proteine möglicherweise um die gleiche Bindungsstelle an P-TEFb kompetieren, ähnlich zu einem Mechanismus, der bereits für HIV-1 Tat und Hxm1 beobachtet wurde (Barboric et al., 2007). Tat bindet zusammen mit der TAR RNA an Helix 4 und 5 der ersten Cyclinbox von CycT1 (Anand et al., 2008). Ebenso bindet Hxm1 über eine C-terminale T1-Bindungsdomäne (TBD) an die Cyclin-Boxen von CycT1 (Michels 2003; Schulte et al., 2005), und eine Konkurrenz von Hxm1 TBD und Tat/TAR um die Bindung an die Cyclin-Boxen von CycT1 ist in der Vergangenheit beschrieben worden. Diese Konkurrenz war durch einen GST-Immobilisationstest gezeigt worden, bei dem an CycT1 gebundenes Hxm1 TBD durch Tat/TAR verdrängt werden konnte (Barboric et al., 2007) und welcher nun zur Untersuchung der potentiellen Verdrängung von Hxm1 durch CT verwendet wurde.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, konnte die Verdrängung von Hxm1 von CycT1 durch Tat/TAR reproduziert werden. Das an GSH-Matrix immobilisierte GST-CycT1 (Spur 1) bindet das Hxm1-Konstrukt TBD (Bande bei etwa 16 kDa, Spur 2 und 10). Durch Zugabe von ansteigenden Mengen an Tat/TAR von 0,1-3,2 nmol konnte eine schrittweise Bindung von Tat/TAR an GST-CycT1 beobachtet werden (etwa 18 kDa, Spuren 3-8, 11). Diese Bindung

von Tat und TAR ging einher mit einer Abnahme der Bindung von TBD. Somit konnte das an CycT1 (1-281) gebundene Hxm1 durch die Zugabe von Tat und der TAR RNA verdrängt werden. Da weder TBD noch Tat/TAR mit immobilisiertem GST (Spur 9) interagierten, konnte eine unspezifische Reaktion mit GST ausgeschlossen werden.

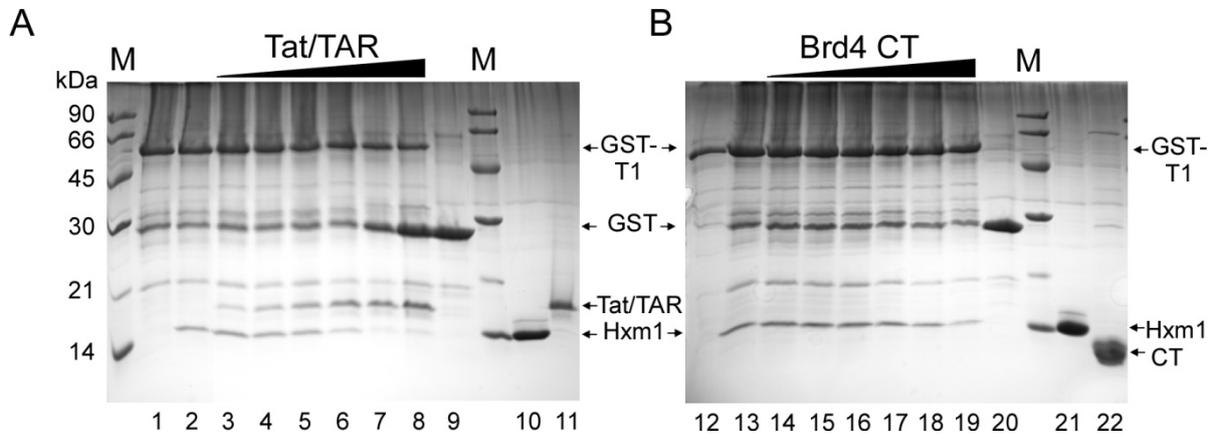


Abbildung 27: Verdrängungsexperiment zur Bindung von HIV-1 Tat/TAR und CT an CycT1. A) Nach der Bindung von 0,4 Hxm1 TBD (Spur 2-8) an immobilisiertes GST-CycT1 (1-281) konnte dies durch Zugabe von 0,1-3,2 nmol Tat/TAR verdrängt werden. Beide Proteine interagierten nicht mit immobilisiertem GST. 3 µg Hxm1 TBD und Tat/TAR sind in den Spuren 10 und 11 zum Vergleich der Bandenhöhe aufgetragen. B) Wurde jedoch CT zu immobilisiertem GST-CycT1 mit gebundenem TBD gegeben, konnte keine Veränderung des Bindungslevels von Hxm1 TBD in den Spuren 13-19 festgestellt werden. Die Spuren 21 und 22 zeigten Hxm1 TBD und CT zum Vergleich der Laufhöhe der Proteine.

Dieses Verdrängungsexperiment wurde nun mit CT als potentielltem Gegenspieler von Hxm1 durchgeführt und Hxm1 TBD an immobilisiertes GST-CycT1 gebunden (Abbildung 27 B, Spuren 13-19 und Spur 21). Durch ansteigende Mengen von CT wurde jedoch keine Verdrängung von Hxm1 vom immobilisierten GST-CycT1 erreicht, und Hxm1 blieb auch bei hohen CT-Konzentrationen an CycT1 gebunden. Im Kontrast zu Tat/TAR, welche schon mit 0,4 nmol durch seine Bindung an CycT1 im Gel identifiziert wurden (Abbildung 27 A, Spur 3), interagiert CT nicht mit GST-CycT1. Durch den vorliegenden Verdrängungstest konnte somit eine Bindung an CycT1 (1-281), wie sie für Hxm1 TBD und Tat/TAR gezeigt werden konnte, für CT ausgeschlossen werden.

Bei der funktionellen Charakterisierung des Einflusses von Brd4 auf P-TEFb wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Aktivierung von P-TEFb durch die C-terminale Domäne (CT) von Brd4 vermittelt wird. Diese Domäne ermöglicht eine Stimulierung der Kinaseaktivität von P-TEFb um 40% und hebt den inhibitorischen Effekt von Hxm1 zu 85% auf. Die Aktivierung beruht nicht auf einer Verdrängung von Hxm1, sondern wird vermutlich über eine Interaktion mit Cdk9 vermittelt. Für die Bindung von P-TEFb und CT wurde ein K_d von 1,2 µM nachgewiesen. Obwohl sie nicht wie das HIV-1 Tat-Proteine von der TAR RNA oder alternativ von der 7SK snRNA abhängt, spielen Bereiche positiver Ladung dabei eine entscheidende, wenngleich bislang ungeklärte Rolle.

4.2 Erkennung von Histonmotiven durch die Bromodomänen von Brd4

Nachdem unter 3.1 gezeigt werden konnte, dass die C-terminale Domäne, aber nicht die Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4 an der Aktivierung von P-TEFb beteiligt sind, sollte im Folgenden eine strukturelle und funktionelle Untersuchung der Bromodomänen und ihrer Interaktion mit Histonen erfolgen. Dafür wurde die Struktur der Bromodomänen bestimmt und deren Bindung an acetylierte und anderweitig modifizierte Histonfragmente charakterisiert.

4.2.1 Darstellung und Kristallisation der Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4

Zur Bestimmung der Strukturen der Bromodomänen von Brd4 wurde die Kristallisation verschiedener Konstrukte der beiden Domänen des Proteins versucht. Für Kristallisationsexperimente wurden fünf Konstrukte der ersten Bromodomäne BD1 von Brd4 sowie zwei Konstrukte der zweiten Bromodomäne BD2 erstellt (siehe 3.8.2-3.8.5). Durch Größenausschlusschromatographie wurden Homogenität und Oligomerisierungsgrad der Proben überprüft (dargestellt in Abbildung 28).

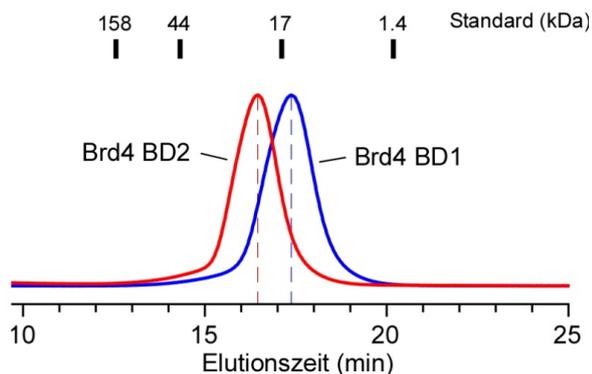
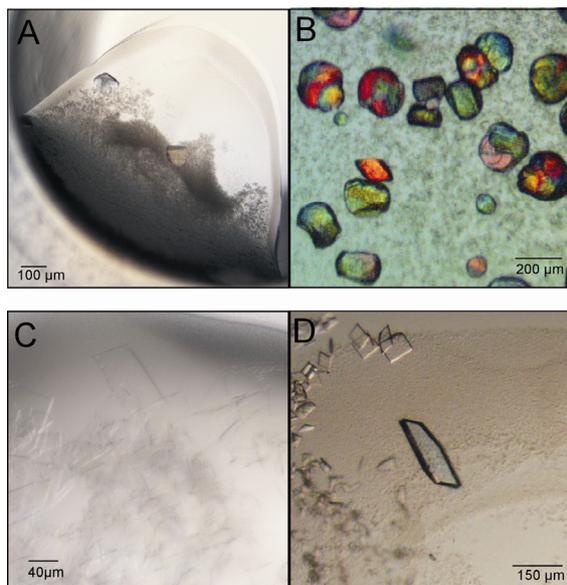


Abbildung 28: Größenausschlusschromatographie von Brd4 BD1 (54-168) und BD2 (349-464). Die Elutionsprofile von BD1 und BD2 zeigen einen definierten Hauptpeak bei einer Retentionszeit von 17,3 min für BD1 und 16,4 min für BD2. Ein aufgetragener Proteingrößenstandard (Fa. Biorad) erlaubte eine Abschätzung der apparenten Proteinmassen zu 16 kDa für BD1 und 21 kDa für BD2. Von beiden Proteinen wurden 100 µg auf eine S75-Säule aufgetragen. Die Höhe der Peaks wurde zur besseren Vergleichbarkeit aufeinander normiert.

Beide Proteindomänen eluierten in einer homogenen Elutionsbande, BD1 zeigte dabei ein apparentes Molekulargewicht von 16 kDa, welches durch die Eichung auf einen Proteinstandard (Fa. Biorad) approximiert werden konnte. Bei einer berechneten Masse von 14,2 kDa deutet dies auf eine monomere Proteindomäne in Lösung hin. BD2 zeigte ein apparentes Molekulargewicht von 21 kDa in der Größenausschlusschromatographie und könnte aufgrund der höheren gemessenen Masse im Vergleich zur berechneten Masse von 13,9 kDa in dimerisierter Form vorliegen.

Um detaillierte Einblicke in die Struktur der Bromodomänen von Brd4 zu gewinnen, wurde unter Verwendung der erstellten BD1- und BD2-Proteine versucht, Kristalle für Röntgenbeugungsexperimente zu gewinnen. Initiale Kristalle der ersten Bromodomäne BD1 von Brd4 konnten durch das Konstrukt mit den Grenzen 42-168 gewonnen werden, während die übrigen BD1-Konstrukte nicht zu Kristallwachstum führten. Optimales Kristallwachstum wurde in 3,6 M Na-Format und 10% Glycerin bei 20°C erreicht (Abbildung 29 A, B), wodurch Kristalle der Größe 100 x 50 x 20 µm gewonnen wurden. Diese Kristalle von BD1 streuten an

einer Synchrotron-Strahlenquelle (SLS, Villigen, Schweiz) bis zu einer Auflösung von 1,55 Å. Kristalle der zweiten Bromodomäne BD2 konnten für ein Konstrukt mit den Grenzen 349-464 gewonnen werden, als optimierte Kristallisationsbedingung wurde 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 und 25% PEG 2000 MME zum Erhalt von 200 x 150 x 20 µm BD2-Kristallen eingesetzt (Abbildung 29 C, D). Diese Kristalle streuten am SLS bis zu einer Auflösung von 1,2 Å. Die Datensätze für BD1 und BD2 wurden prozessiert und die Kristallstruktur auf Grundlage der Strukturen 2OSS und 2OUO (Filippakopoulos et al., *Structural Genomics Consortium*, Oxford) durch molekularen Ersatz gelöst (Details siehe 3.9.4). Die asymmetrische Einheit beider Kristalle enthielt jeweils genau ein BD-Molekül. Die Strukturen konnten zu R-Faktoren als Maß der Güte der Struktur von 18,4/22,0 ($R_{\text{fact}}/R_{\text{free}}$) für BD1 und 11,6/14,5 für BD2

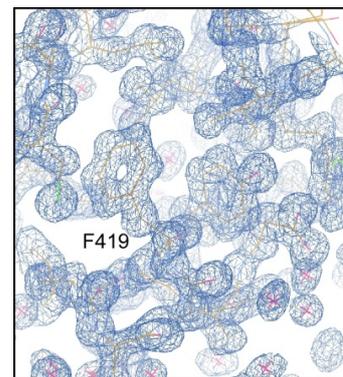


verfeinert werden. Die Statistiken der Struktur-
lösung und -verfeinerung sowie die
Definitionen für $R_{\text{fact}}/R_{\text{free}}$ sind in Tabelle 1
sowie im Anhang aufgeführt.

Abbildung 29: Initiale und optimierte Kristalle der Bromodomänen BD1 und BD2. A) Initiale Kristalle von BD1. B) Nach Optimierung wuchsen die Kristalle zu einer Größe von 100 x 50 x 20 µm, für Röntgenbeugungsaufnahmen wurden jene Kristalle mit glatten, definierten Kanten verwendet. C) Initiale Kristalle von BD2 vor Optimierung D) BD2-Kristalle erreichten eine Größe von 200 x 150 x 20 µm. Kristalle beider Proteine wurden in 20% EG überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die hohe Auflösung der beiden Datensätze von 1,5 Å (BD1) und 1,2 Å (BD2) erlaubte eine zuverlässige Zuordnung der Aminosäuren nebst Seitenketten in die errechneten Elektronendichte (Abbildung 30). Zusätzlich zeigte sich definierte Elektronendichte für Ethylenglykol und Glycerin, welche den Kristallisations- und Frostfrierlösungen entstammten, sowie für eine Vielzahl von Wassermolekülen.

Abbildung 30: $2F_o - F_c$ -Elektronendichte von BD2 bei 1,2 Å. Die hohe Auflösung ermöglichte eine sichere Zuordnung der Seitenketten. Die Elektronendichteverteilung ist hier am Beispiel der aromatischen Seitenkette von F419 der σ B-Helix bei 1,0 σ durch das Modellbauprogramm Coot (Emsley und Cowtan, 2004) dargestellt.



4.2.2 Kristallstrukturen der Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4

Die Strukturen von BD1 und BD2 zeigen beide die typische Bromodomänenfaltung, bei welcher der konservierte Körper der Proteindomäne durch vier linksgängige α -Helices (α Z, α A, α B, α C) gebildet wird (Abbildung 31; Zeng und Zhou, 2002). Die Helices bilden durch

Interaktionen hydrophober und aromatischer Aminosäuren ein vier-Helix-Bündel aus, deren N- und C-Termini nah beieinander liegen. Distal von N- und C-Terminus der BDs formen zwei Schleifen zwischen den Helices αZ und αA (ZA-Schleife) bzw. αB und αC (BC-Schleife) eine tiefe Tasche für die Bindung von Interaktionssequenzen (Abbildung 31). Die Bindungstasche der Bromodomänen wird wesentlich von den 20 Aminosäuren der ZA-Schleife geformt, die zwischen den Helices αZ und αA liegt. Sie enthält drei kurze, α -helikale Regionen, welche in beiden Strukturen auftreten: $\alpha Z'$ oberhalb der Bindungstasche besteht in BD1 nur aus der Sequenz WPF, welche sich durch Stacking-Interaktionen der aromatischen Ringsysteme gegenseitig stabilisiert und zum hydrophoben Charakter der Bindungsumgebung innerhalb der Tasche beiträgt (siehe hierzu 4.2.3, Abbildung 38). Diese drei Aminosäuren sind ebenfalls in BD2 konserviert, dort erstreckt sich $\alpha Z'$ jedoch über 10 Reste, die eine gebogene Helix zu αZ bilden. $\alpha Z''$ und $\alpha Z'''$ bilden die dem Bromodomänenkern entgegengesetzte, äußere Begrenzung der Bindungstasche.

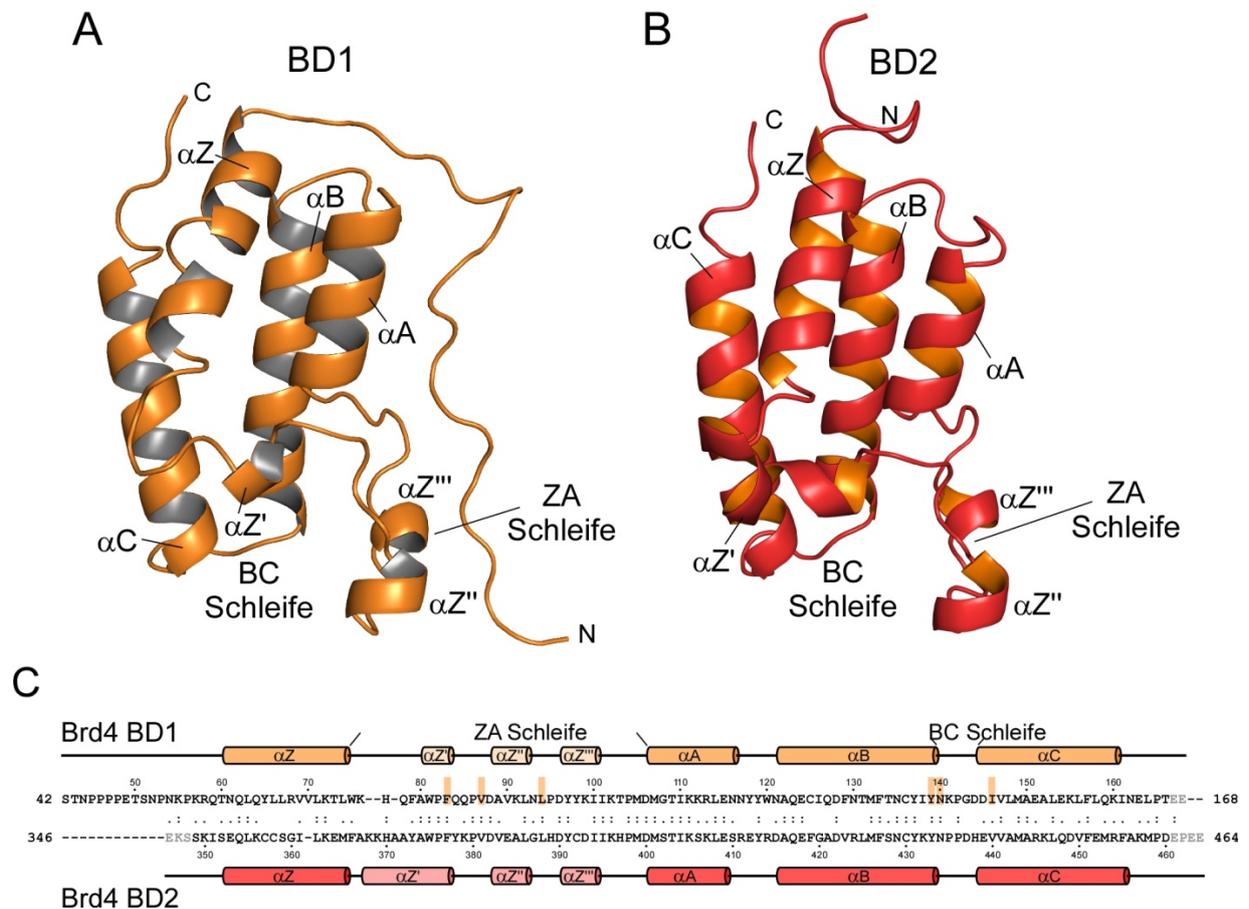


Abbildung 31: Kristallstrukturen der Bromodomänen BD1 und BD2 von mBrd4. (A) BD1 (42-166) und (B) BD2 (349-460) bestehen aus vier α -Helices (αZ , αA , αB , αC), welche durch hydrophobe Wechselwirkungen den Bromodomänenkern bilden. Die zwei verbindenden Schleifen BC und ZA bilden eine Bindungstasche zur Bindung von Acetyllysine-Sequenzen. Die BC-Schleife beinhaltet das für die Acetyllysine-Bindung essentielle Asparagin, während ZA aus den helikalen Bereichen $\alpha Z'$, $\alpha Z''$ und $\alpha Z'''$ besteht, die die Tasche nach außen abgrenzen. (C) Der Sekundärstruktur- und Sequenzvergleich von BD1 und BD2 spiegelt den hohen Konservierungsgrad von 42,4% der BDs von Brd4 wider. In der Sequenz von BD1 sind die Reste orange markiert, die für die Bindung eines Acetyllysins entscheidend sind.

Tabelle 1: Kristallographische Parameter der Strukturlösung von Brd4 BD1 und BD2

	Brd4 BD1	Brd4 BD2
Datenaufnahme		
Wellenlänge [Å]	1,00	0,97642
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszelle a, b, c [Å] α, β, γ [°]	a=34,01, b=47,44, c=78,02 α=β=γ=90°	a=52,06, b=73,05, c=32,30 α=β=γ=90°
Auflösung [Å]*	19,6 – 1,55 (1,6-1,55)	19,5 – 1,2 (1,25-1,2)
Gemessene Reflektionen*	146 605 (13 213)	195 195 (20 535)
Einzigartige Reflektionen*	18 865 (1 668)	39 272 (4460)
R _{merge} [%]*	8,2 (43,6)	8,0 (41,5)
Multiplizität*	7,7 (7,9)	5,0 (4,6)
<I/σ>*	15,4 (5,1)	20,4 (4,0)
Vollständigkeit [%*]	99,4 (99,5)	99,9 (100,0)
Modellverfeinerung/Refinement		
Inhalt des Modells	mol A: MG- S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 Glycerin, 1 EG 111 Wasser	mol A: GAMG-S ₃₄₉ -D ₄₆₀ 3 EG, 2 β-ME 219 Wasser
Gesamtzahl der Atome	1177	1231
Anzahl der Wassermoleküle	111	219
Lösungsmittelanteil (%)	40	30
R _{factor} (%)*	18,4 (23,9)	11,6 (15,3)
R _{free} (%)*	22,0 (25,2)	14,5 (20,9)
rms der Bindungen [Å]	0,026	0,030
rms, der Winkel [Å]	2,238	2,525
 Gesamtz [Å ²]	24,6	15,5
Ramachandran plot	begünstigte : 91,8%	begünstigte: 93,3%
	erlaubt : 8,2%	erlaubt : 5,8%
		unerlaubt: 1%

Den αZ“- und αZ“-Schleifen gegenüber befindet sich die kurze BC-Schleife, die die Verbindung von αB und αC bildet. Sie enthält das hochkonservierte Asparagin N140 (BD1) bzw. N434 (BD2), welches Teil des YN-Motivs ist und über eine Wasserstoffbrücke von N140 bzw. N434 die Interaktion zu einem Acetyllysin vermittelt (Abbildung 32; siehe auch 4.2.3).

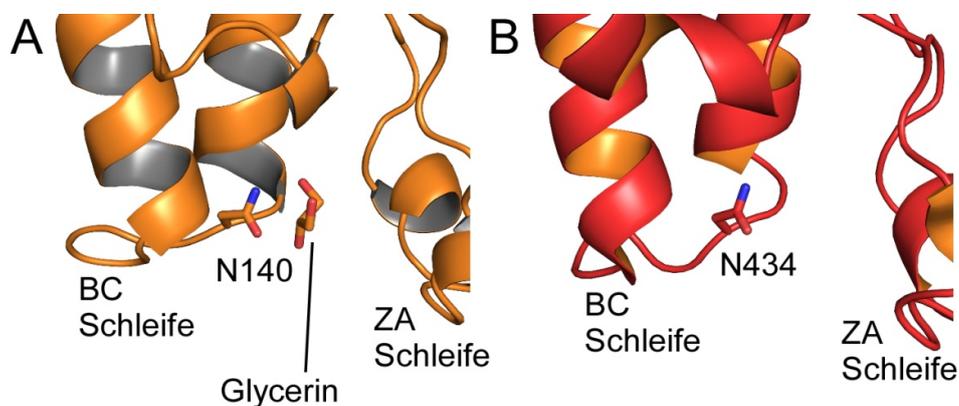
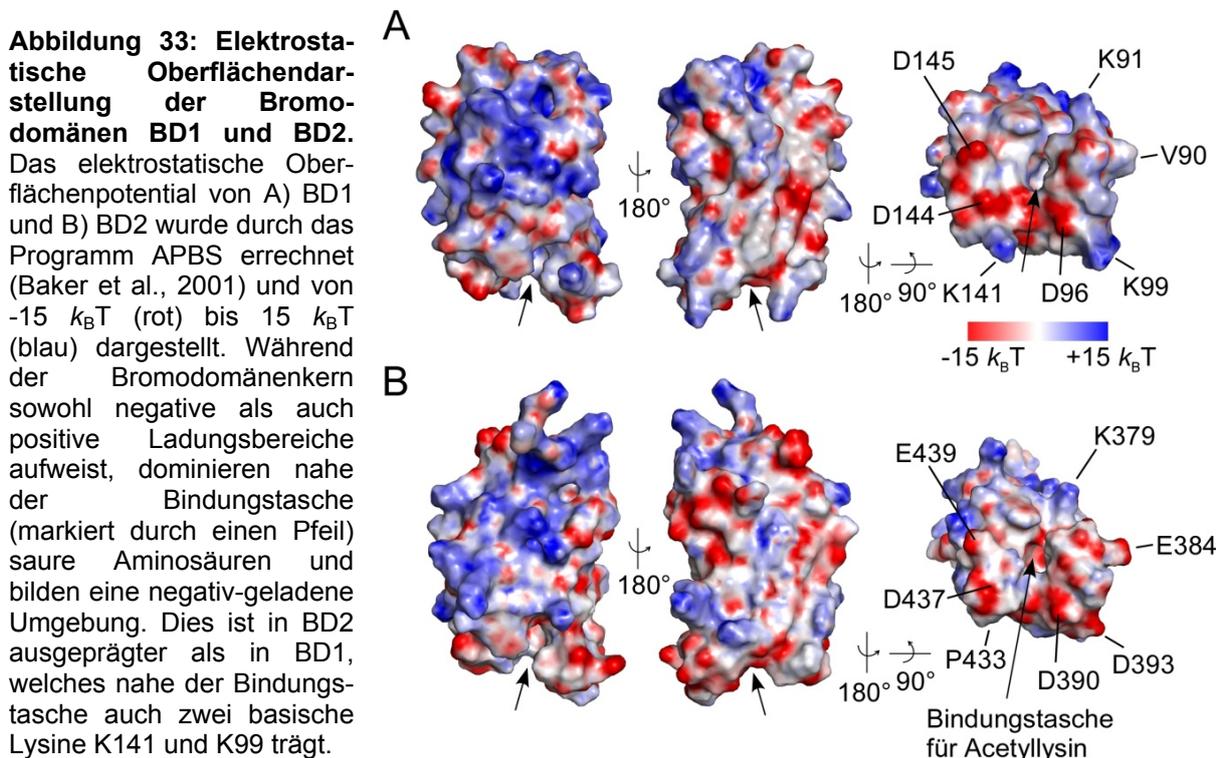


Abbildung 32 Bindungstaschen von BD1 und BD2. A) In der Acetyllysin-Bindungstasche von BD1 wird N140 von einem Glycerinmolekül gebunden. B) In BD2 ist dies nicht der Fall, hier markiert N434 die Bindungsstelle für Acetyllysin in der Bindungstasche der Bromodomäne.

Auch in Abwesenheit eines Bindungspartners ragt dieses Asparagin in die Bindungstasche und markiert damit die potentielle Bindungsposition des acetylierten Histons. Der direkte Vergleich der Sekundärstrukturelemente und der Sequenzen von BD1 und BD2 zeigt die hohe sequenzielle und strukturelle Konservierung der Bromodomänen (Abbildung 31 C). Die Position der α -Helices α Z bis α C innerhalb der Bromodomänen stimmen weitestgehend überein, besonders viele Parallelen in den Sequenzen zeigen sich in den Helices α A sowie α Z' und α Z'''. Insgesamt beträgt die Sequenzidentität zwischen BD1 und BD2 42,4% (siehe auch Abbildung 34).

In der freien BD1-Struktur wird die Position des Acetyllysins in Wasserstoffbrückenabstand zu N140 von einem Glycerinmolekül besetzt. Glycerin wurde sowohl als Bestandteil der Reinigung als auch des Kristallisationspuffers zugesetzt. Auch Ethylenglykollmoleküle, welche zum Schutz des Kristalls beim Frieren eingesetzt wurden, finden sich in beiden Strukturen. Zwei auf der Oberfläche liegende Cysteine C357 und C392 in BD2 bilden zudem eine Disulfidbrückenbindung mit β -Mercaptoethanolmolekülen aus dem Reinigungspuffer aus. Die Modelle der Strukturen von BD1 und BD2 beinhalten zudem 111 bzw. 219 Wassermoleküle.

Eine Berechnung der elektrostatischen Oberfläche der beiden Bromodomänen gab Auskunft über mögliche Unterschiede der Ladungsoberfläche und Hinweise auf unterschiedliche Bindungspräferenzen der BDs (Abbildung 33).

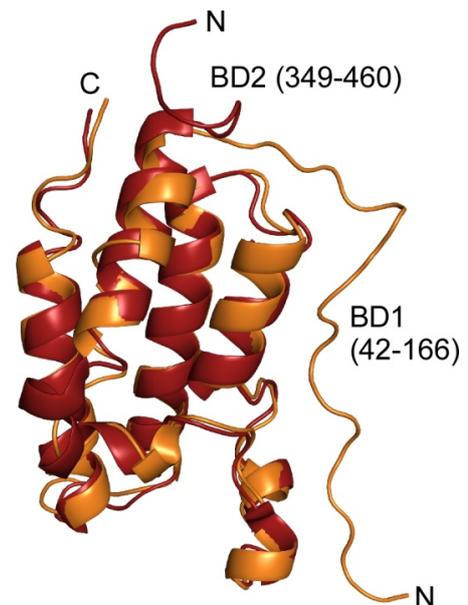


Das Bromodomänenbündel aus den vier Helices zeigt eine ausgeglichene Ladungsverteilung, an Helix α Z dominieren basische Aminosäuren (Abbildung 33, blau), während an α C mehr Aminosäuren mit sauren Seitenketten auftreten (Abbildung 33, rot). Die Umgebung der Acetyllysinebindeungstasche von BD1 und BD2 aus den BC- und ZA-Schleifen weist ein negatives Ladungspotential durch eine Reihe von sauren Aminosäuren (D96, D141 und D145 in BD1; D390, D437 und E439 in BD2) auf. Während jedoch BD1 nahe der Bindungs-

tasche auch basische Reste trägt (K99 und K14), sind diese Positionen in BD2 von sauren oder neutral geladenen Resten (D393, P433) eingenommen. Auch E384 trägt zur negativen Ladung der Bindungsfläche in BD2 bei, während sich in BD1 an dieser Position ein neutrales Valin befindet. Diese lokalen Ladungsunterschiede im Bereich der Acetyllysinebindestasche bilden möglicherweise die Grundlage unterschiedlicher Spezifität dieser Bromodomänen für die zu bindenden Histonfragmente.

Sowohl die Struktur von BD1 als auch die von BD2 zeigt neben der eigentlichen Bromodomäne noch einen gut aufgelösten N-Terminus, welcher sich bei BD1 über 20 Aminosäuren, bei BD2 über sieben Aminosäuren N-terminal der α Z-Helix erstreckt (Abbildung 34). Während dieser N-Terminus in BD2 von der Bromodomäne weggerichtet ist, faltet er sich in der BD1-Struktur über die Helices weg zu α A hinüber und interagiert bis hinunter zu α Z'' mit Seitenketten der Helices. Diese Interaktionen könnten eine Erklärung für die überraschend ausgeprägte Elektronendichte des vermutlich konformationell flexiblen N-Terminus liefern. Gleichzeitig ist es denkbar, dass die Interaktionen zur Stabilisierung von α Z'' beitragen und die hohe Auflösung der Struktur von 1,5 Å ermöglichen. Eine Überlagerung der Strukturen von BD1 und BD2 zeigen jedoch, dass diese Stabilisierung von α A und α Z'' durch den N-Terminus vermutlich keinen Einfluss auf die Konformation dieser Strukturelemente hat, da sie in BD1 und BD2 weitestgehend übereinstimmen (Abbildung 34). Anhand dieser Überlagerung wird zudem die hohe Konservierung der Bromodomänen-faltung in BD1 und BD2 sichtbar: Die relative Position der einzelnen Helices und Schleifen stimmt fast vollständig überein und zeichnet sich durch einen *rmsd*-Wert (engl. *root mean square deviation*; Wurzel des mittleren Abstandsquadrats) von 0,83 Å der Rückgrat-atome aus.

Abbildung 34: Strukturüberlagerung der Strukturen von BD1 und BD2. Die Strukturen von BD1 (orange) und BD2 (rot) weichen nur geringfügig voneinander ab mit einem *rmsd*-Wert von 0,83 Å ab.



Auch die Position der Helices α Z, α Z'' und α Z''' stimmen überein, wenngleich in BD1 ausgedehntere Bereiche in α -helikaler Form vorliegen als in BD2 (siehe Abbildung 35). Ein Vergleich der Sequenzen der BDs von mBrd4 mit Bromodomänen der BET-Familie anderer Spezies oder anderen prominenten Bromodomänenproteinen spiegeln die hohe Konservierung der Bromodomänen wider (Abbildung 35 A). Die farbliche Markierung von konservierten Resten von 100% Identität (pink) bis 60% Identität bzw. 80% Homologie (gelb) verdeutlicht, dass ein Großteil der Aminosäuren in Bromodomänen direkt oder durch homologe Reste erhalten ist. Auch hier stechen α Z' und α A durch eine besonders hohe Anzahl von hochkonservierten Resten hervor. Andere Helices wie α Z und α C sind in ihrer Sequenz weniger stark konserviert.

Überträgt man diese Identitäts- bzw. Homologiewerte auf die Struktur von Brd4 BD2, so wird deutlich, dass hochkonservierte Bereiche besonders in der Bindungstasche und

deren direkter, formgebender Umgebung zu finden sind (Abbildung 35 B, fünf Abstufungen von pink bis weiß). Auch das YN-Motiv in der BC-Schleife, welches die Bindung von Acetyllysin vermittelt, ist in allen untersuchten Bromodomänen erhalten. Dabei wird deutlich, dass die Sequenzen von BD1 bzw. BD2 unterschiedlicher Proteine und Spezies stärker konserviert sind als die Sequenzen der BDs eines Proteins untereinander sind.

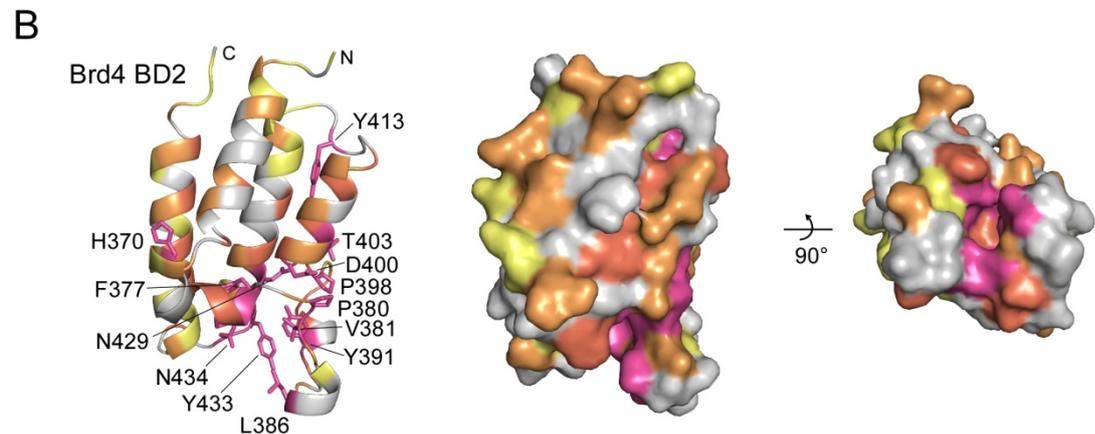
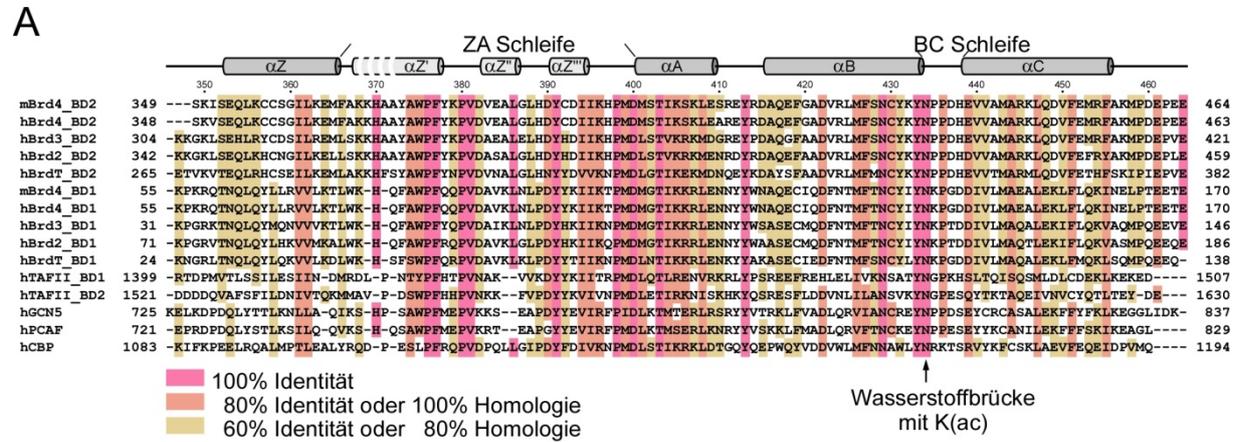


Abbildung 35: Konservierung der Bromodomänen von Brd4. A) Sequenzvergleich von BET-Familie BDs und anderen Bromodomänen-Proteinen. Aminosäuren von hoher Konservierung wurden farblich hervorgehoben. B) Die farbliche Darstellung von konservierten Resten in der Struktur von Brd4 BD2 in fünf Stufen von pink (in allen BDs erhalten) bis weiß (nicht konserviert) zeigt die spezielle Konservierung von Resten in der Bindungstasche von BDs und in der strukturgebenden Umgebung. Reste auf der Oberfläche von BD2 (mittlere und rechte Darstellung) zeigen nur eine leichte Konservierung.

4.2.3 Interaktion von BD1 und BD2 mit acetylierten Histonfragmenten

Die vorliegenden Kristallstrukturen von BD1 und BD2 lieferten eine ideale Basis zur näheren Untersuchung der Interaktion der Bromodomänen von Brd4 mit Histonsegmenten, welche ein acetyliertes Lysin tragen. Im Folgenden wurden einerseits die thermodynamischen Parameter der Bindung von Brd4 BDs an Histonfragmente per Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Andererseits zeigte die Ermittlung der Struktur von BDs in Komplex mit unterschiedlichen Histonpeptiden die genaue molekulare Interaktion zwischen Bromodomänen und den Acetyllysinen. Hierfür wurden chemisch synthetisierte Oktapeptide H3-K14(ac), H4-K5(ac) und H4-K16(ac) verwendet, deren Sequenz und Acetylierungsstelle von den Histonen H3 und H4 übernommen wurden. Alle drei trugen das Acetyllysin an dritter Position sowie C-terminal Arginin oder Lysin an Position +3 zum

Acetyllysin, welche in Bromodomänen für stabilisierende Kontakte verantwortlich sein können (Owen et al., 2000). Die hier ausgewählten acetylierten Histonmotive waren in der Vergangenheit als Bindungsplattform für Brd4 identifiziert worden (Dey et al., 2003, Sequenzen siehe 3.4).

Analyse der Affinitäten von Brd4 BDs an acetylierte Histonsegmente

Zunächst wurden mittels ITC-Messungen die Dissoziationskonstanten K_d als Maß für die Stärke der Bindung von BD1 und BD2 zu den Histonpeptiden H3-K14(ac), H4-K5(ac) und H4-K16(ac) bestimmt. Veröffentlichte Dissoziationskonstanten für Bromodomänen zu Acetyllysin-enthaltenden Peptiden liegen im hohen μM bis niedrigen mM Bereich (Dhalluin et al., 1999; Hudson et al., 2000; Shen et al., 2007; Zeng et al., 2008). Die für die Messungen verwendeten Bromodomänen BD1 und BD2 wurden daher auf eine hohe Konzentration von mindestens 5 mM gebracht, um auch diese schwachen Interaktionen quantifizieren zu können. In Abbildung 36 wurden die ITC-Messungen von BD1 gegen die drei Histonfragmente sowie die ermittelten Daten dargestellt. Die Kontrollmessungen sowie eine Auflistung der detaillierten Konzentrationen sind im Anhang in Abbildung 73 und Tabelle 5 aufgeführt.

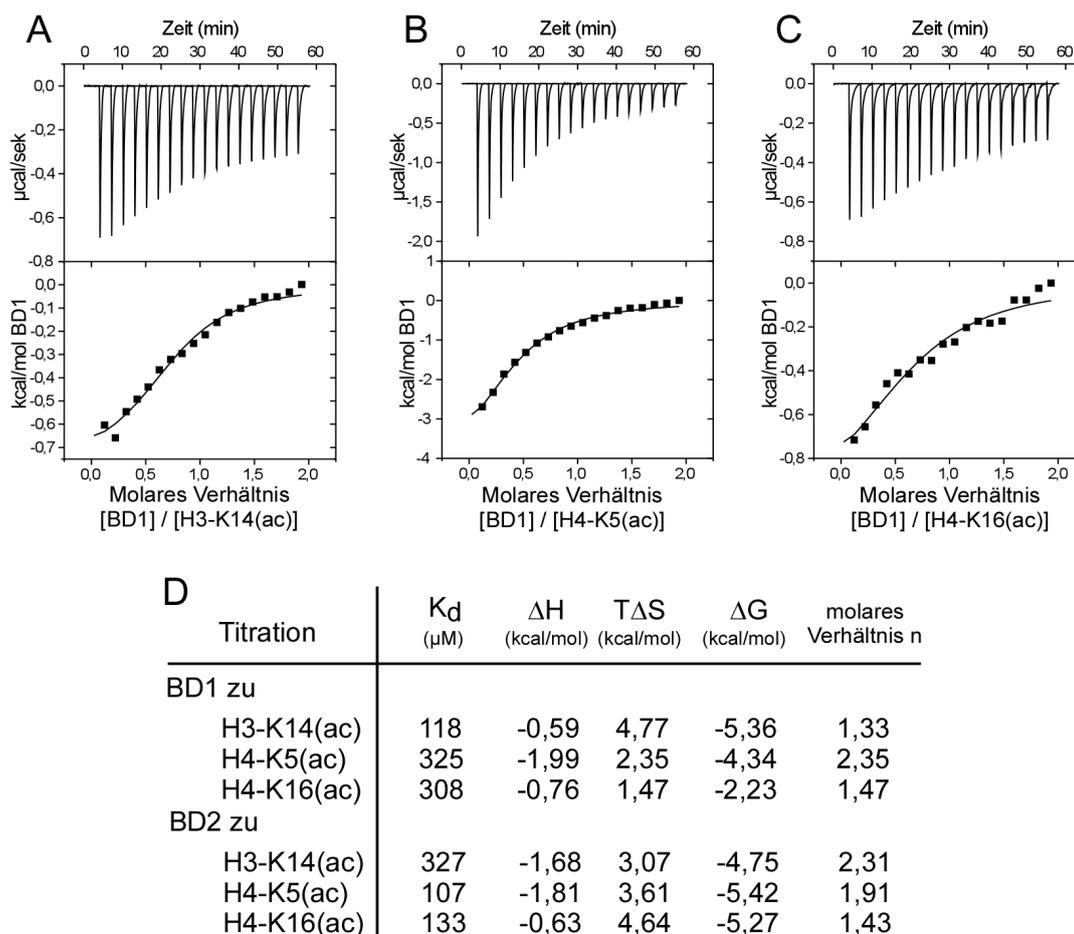


Abbildung 36: ITC-Messungen von BD1 und BD2 und acetylierten Histonpeptiden. A) Titration von 5,9 mM BD1 gegen 590 μM H3-K14(ac). B) Titration von BD1 gegen H4-K5(ac). C) Titration von BD1 gegen H4-K16(ac). D) Auflistung der Ergebnisse der ITC-Messungen von BD1 und BD2 zeigen schwache Affinitäten im Bereich von 100-300 μM für die Bindung der Bromodomänen von Brd4 an acetylierte Histonpeptide. Aufgeführt sind die Änderungen der Enthalpie ΔH , der Entropie in Abhängigkeit von der Temperatur $T\Delta S$ und der freien Gibbs'sche Energie ΔG .

Die gemessenen ITC-Daten der beiden Bromodomänen von Brd4 und der drei Histonfragmente zeigten für alle drei Histonpeptide H3-K14(ac), H4-K5(ac) und H4-K16(ac) eine Bindung an BD1 und BD2. Messungen unter Verwendung von BD2 wurden um die auftretende Wärmetönung der Titration von BD2 in Puffer korrigiert. Durch Anpassung der aufgenommenen, integrierten Wärmetönungskurven in eine Titrationskurve ergab sich ein K_d von 118 μM für die Bindung von BD1 und Peptid H3-K14(ac). Dagegen liegen die ermittelten K_d 's der Bindungen von BD1 an die beiden H4-Peptide bei einem dreifach höheren Wert von 325 μM (H4-K5(ac)) bzw. 308 μM (H4-K16(ac), Abbildung 36).

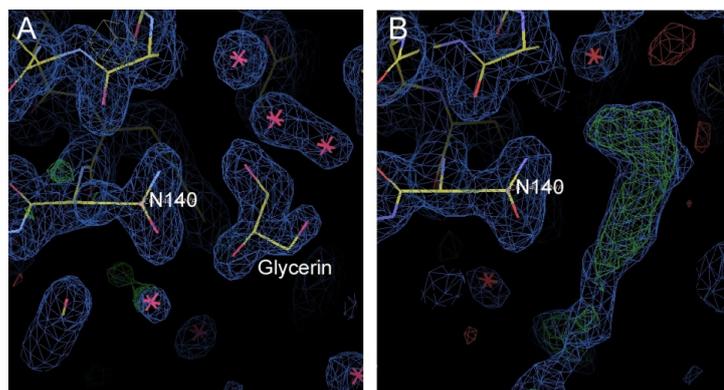
Interessanterweise zeigte BD2 eine entgegengesetzte Präferenz zu den H4-Peptiden: Während H3-K14(ac) mit einer Affinität von 327 μM an BD2 bindet, sind die bestimmten K_d 's für die H4-Peptide mit 107 μM (H4-K5(ac)) und 133 μM (H4-K16(ac)) um ein Dreifaches niedriger. In einem ITC-Experiment, in welchem anstatt der Histonpeptide nur Acetyllysin als freie Aminosäure verwendet wurde, konnte keine Bindung an BD1 festgestellt werden. Die gemessenen freien Gibb'schen Energien ΔG° der Reaktionen lagen bei Werten zwischen -2,23 und -5,4 kcal/mol und resultierten im Wesentlichen aus dem Beitrag der Entropie (Abbildung 36). Die bestimmten Stöchiometrien der Bindungen, ausgedrückt im molaren Verhältnis n der Titranten zueinander, lagen bei 1,33 (BD1 zu H3-K14(ac)) bis zu 2,35 (BD1 zu H4-K5(ac)) weit über eine 1:1-Bindung von Bromodomänen und Histonpeptiden (dies entspräche einem n von 1).

Insgesamt konnten so Affinitäten von BD1 und BD2 an die untersuchten Histonfragmente bestimmt werden, die K_d 's im hohen μM -Bereich besaßen. Dabei deutete sich eine Präferenz von BD1 zu Peptiden des Histons H3 H3-K14(ac) und von BD2 zu Histon 4 H4-K5(ac) und H4-K16(ac) an, die sich in K_d 's von 100 μM zu dem präferierten Histon gegenüber dreifach schlechteren K_d 's zum nicht-präferierten Histon äußerte.

Kristallographische Untersuchung des Komplexes aus BD1 mit Acetyllysinpeptiden

In den drei Strukturen der Peptid-inkubierten Kristalle wurde an der Position, die sonst Glycerin einnahm, zusätzliche Elektronendichte identifiziert, die einem Acetyllysin entsprach. Zur Untersuchung der Interaktion von acetylierten Histonpeptiden mit den Bromodomänen von Brd4 wurden die vorliegenden BD1-Kristalle mit einem 20-fachen molaren Überschuss der drei Histonpeptide inkubiert und anschließend zur Detektion der entsprechenden Röntgendiffraktionsdatensätze verwendet. Die Datensätze erreichten eine Auflösung von 1,4 – 1,8 Å und konnten durch molekularen Ersatz gelöst werden (Tabelle 2).

Abbildung 37: Elektronendichte der ungebundenen und Peptid-gefüllten Bindungstasche von Brd4 BD1. A) Die Bindungstasche von BD1-Kristallen enthält in der Liganden-freien Form ein Glycerinmolekül in Wasserstoffbrückenentfernung zu N140. B) In Gegenwart von acetylierten Histonpeptiden zeigte sich zusätzlich $F_o - F_c$ -Elektronendichte bei $1,5 \sigma$ nahe N140, deren Form einem Acetyllysin entspricht.



In der ungebundenen Struktur (siehe 4.2.2) enthielt die Bindungstasche von BD1 jeweils ein Glycerinmolekül, welches dem Kristallisationspuffer entstammt und Wasserstoffbrücken zum Asparagin 140 (N140) ausbildet (Abbildung 37 A).

Jedoch war die Qualität der Elektronendichte der Acetyllysine nicht in allen Strukturen gleich ausgeprägt, auch konnten die Position der Acetyllysine-umgebenden Aminosäuren nur teilweise identifiziert und zugeordnet werden. Die vollständigste Elektronendichte eines Peptids wurde für BD1 im Komplex mit H3-K14(ac) gefunden und wurde stellvertretend für die anderen Peptide ausgewertet, bis R-Faktoren von 19,6% (R_{fact}) bzw. 25,9% (R_{free}) bei einer Auflösung von 1,8 Å erreicht wurden (Details siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Parameter aus der Kristallisation und Strukturlösung von BD1 und BD2 im Komplex mit acetylierten Histonpeptiden

	Brd4 BD1 mit H3-K14(ac)	Brd4 BD2 mit H3-K14(ac)
Datenaufnahme		
Wellenlänge [Å]	1,00	0,97886
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszelle a, b, c [Å] α , β , γ [°]	a=36,13, b=47,03, c=77,25 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=52,10, b=73,15, c=32,16 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Auflösung [Å]*	19,7 – 1,8 (1,9-1,8)	19,5 – 1,20 (1,25-1,2)
Gemessene Reflektionen*	97 615 (14 698)	365 947 (40 606)
Einzigartige Reflektionen*	12 652 (1857)	37 336 (4 265)
R_{merge} [%]*	6,8 (42,9)	5,2 (23,1)
Multiplizität*	7,7 (7,9)	9,8 (9,5)
$\langle I/\sigma_I \rangle$ *	16,5 (4,7)	23,4 (6,9)
Vollständigkeit [%]*	99,4 (99,9)	95,2 (96,3)
Modellverfeinerung/Refinement		
Gesamtzahl der Atome	1200	1194
Inhalt des Modells	mol A: MG-S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 H3 Peptid (GG AcK A) 1 EG, 104 Wasser	mol A: GAMG-S ₃₄₉ -D ₄₆₀ 2 EG, 2 β -ME 223 Wasser
Anzahl der Wassermoleküle	104	223
Lösungsmittelanteil (%)	42	33
R_{factor} (%)*	19,6 (29,1)	11,6 (13,3)
R_{free} (%)*	25,9 (30,8)	15,0 (14,4)
rms der Bindungen [Å]	0,021	0,034
rms, der Winkel [Å]	1,957	2,359
$\langle B \rangle$ Gesamt [Å ²]	41,1	15,8
Ramachandran plot	begünstigte: 88,4%	begünstigte: 94,2%
	erlaubt :10,7% (zusätzlich) 0,9% (generell)	erlaubt : 5,8%

Jedoch konnten selbst in dieser Struktur nur die Reste GG-K(ac)-A des Oktapeptids der Elektronendichte zugeordnet werden (Abbildung 38). Für die restlichen Aminosäuren des Peptids konnte die Elektronendichte nicht identifiziert werden, vermutlich sind diese strukturell flexibel und nehmen keine definierte Position im Kristall ein. Wie schon in der

ungebundenen Struktur von BD1 wurde zusätzlich ein Ethylenglykollmolekül zwischen den Helices $\alpha Z''$ und αB , sowie 104 Wasser der Kristalldichte angepasst. Das Peptid in der Bindungstasche scheint neben dem Glycerin auch zwei Wasser oberhalb des Glycerins verdrängt zu haben (Abbildung 37).

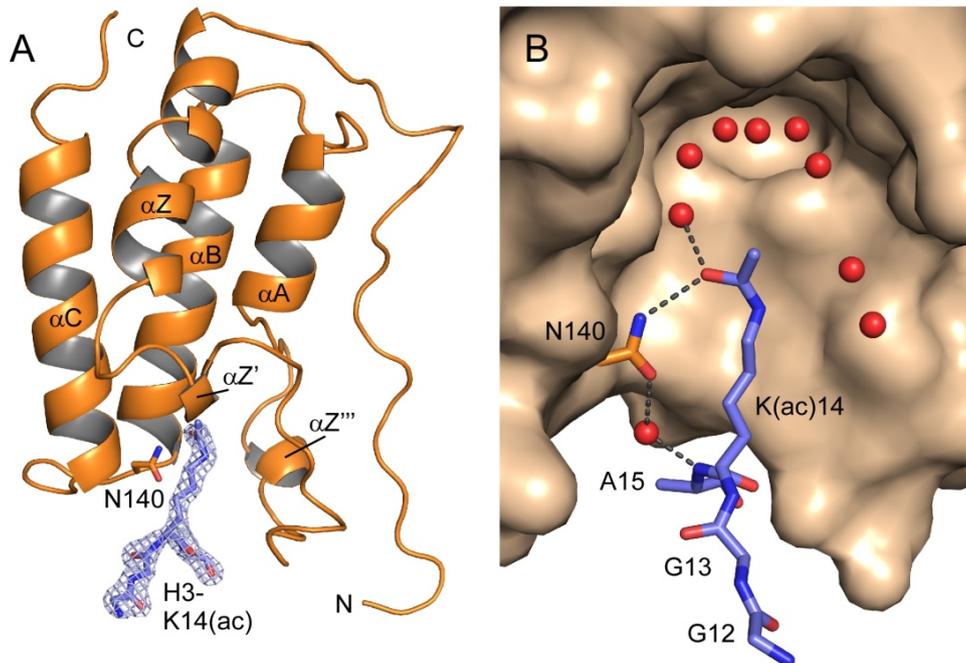


Abbildung 38: Kristallstruktur des Komplexes aus Brd4 BD1 mit acetyliertem Histonpeptid. A) Bändermodell der Struktur von BD1 bei einer Auflösung von 1,8 Å mit der zusätzlichen Elektronendichte, dargestellt bei 1,5 σ , in die die Reste A-K(ac)-G-G des acetylierten H3-K14(ac)-Peptids gebaut werden konnten. Das Peptid bindet in die Bindungstasche aus den BC- und ZA-Schleifen und wird durch N140 koordiniert. B) Detailansicht der Bindungstasche von BD1 mit dem gebundenen Histonpeptid H3-K14(ac). Das Acetyllysin des Peptids bildet über seinen η -Sauerstoff mit der Aminogruppe des N140 eine Wasserstoffbrücke aus. Der δ -Sauerstoff des Asparagins koordiniert zudem ein Wasser, welches als Brücke zum Hauptkettenstickstoff von A15 des Peptids fungiert. Tiefer in der Bindungstasche bilden acht konservierte Wasser ein Netzwerk, welches an der Koordination vom Acetyllysin beteiligt ist.

Die Kristallstruktur von BD1 mit dem gebundenen Peptid zeigt wie auch die ungebundene Bromodomäne die konservierte Faltung aus vier α -Helices und weicht nur minimal von der freien Struktur von BD1 ab (*rmsd*-Wert von 0,29 Å). In der Peptid-gebundenen Form bildet sich jedoch die Helix $\alpha Z''$ nicht aus, wenn auch der Verlauf der Kette nicht beeinflusst wurde (Abbildung 38 A). Diese geringfügige strukturelle Abweichung könnte von Unterschieden in der Kristallqualität und der Verfeinerung der Strukturen herrühren. Das Acetyllysin des Histonpeptids H3-K14(ac) interagiert in der Bindungstasche mit dem in Bromodomänen hochkonservierten N140. Dabei bildet sich zwischen der Aminogruppe des Asparagins und dem η -Sauerstoff des Acetyllysin eine Wasserstoffbrücke über eine Distanz von 3,1 Å aus, welche das modifizierte Lysin in der Bindungstasche positioniert und die einzige direkte Wasserstoffbrücke zwischen Acetyllysin und Bromodomäne darstellt (Abbildung 38 B). Die Koordination des Peptids in der Tasche wird jedoch durch ein Wassermolekül unterstützt, welches jeweils Wasserstoffbrücken zwischen dem Sauerstoff der Seitenkette von N140 und der Amidgruppe von A15 des Peptids ausbildet. Dieses Wassermolekül wurde auch in

anderen Bromodomänenstrukturen wie Gcn5 im Komplex mit einem H4-Peptid an dieser Position zwischen Asparagin und Hauptkette des Peptids identifiziert (Owen et al., 2000). Die Bindungstasche der BD oberhalb des Acetyllysins wird von acht Wassermolekülen ausgefüllt, von denen eines über den η -Sauerstoff des Acetyllysins direkt mit dem Histonpeptid interagiert. Die übrigen Wassermoleküle bilden ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken aus und füllen die Bindungstasche der Bromodomäne (Abbildung 38 B).

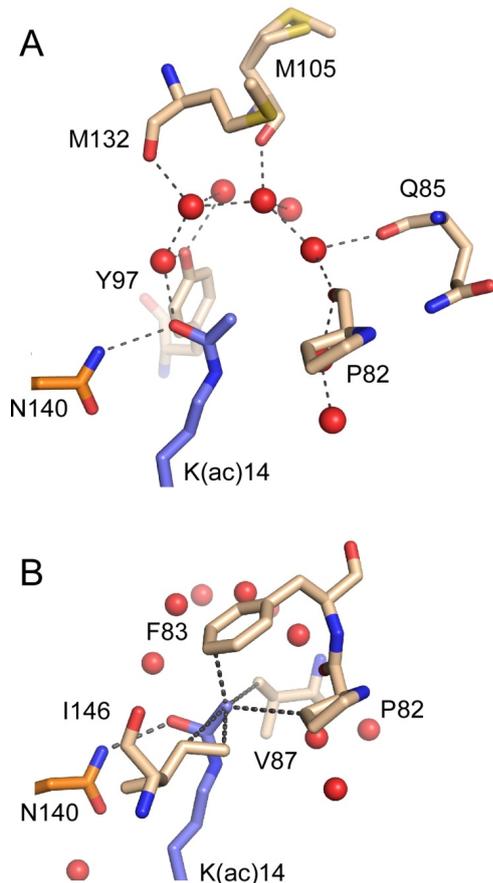


Abbildung 39: Koordination von Acetyllysin innerhalb der BD1-Bindungstasche. A) Innerhalb der Bindungstasche wird ein Netzwerk aus Wassermolekülen gebildet, welches von den Rückgratsauerstoffen der Reste P82, Q85, M105 und M132, sowie dem Seitenkettensauerstoff von Y97 positioniert wird. B) Eine Koordination der Methylgruppe vom Acetyllysin erfolgt durch die Reste P82, F83, V87 und I146, die eine hydrophobe Umgebung für die Acetyllysinmethylgruppe formen.

Sie werden ihrerseits von Resten P82, Q85, M105 und M132 der Bindungstasche koordiniert (Abbildung 39 A). Dabei interagieren die Wassermoleküle mit den Carbonylsauerstoffatomen der Rückgrate der Aminosäuren. Lediglich Y97 interagiert mit den Wassern über das Sauerstoffatom seiner Seitenkette. Neben dieser polaren Bindung des η -Sauerstoffs wird die Methylgruppe des Acetyllysins durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert (Abbildung 39 B). Der hydrophobe Charakter der Bindungstasche wird

über die Seitenketten der Aminosäuren P82, F83, V87 und I146 gebildet, welche ebenfalls innerhalb der Bromodomänenfamilie mäßig (I146) oder sogar vollständig sequenzkonserviert sind (P82, F83, V87, Abbildung 35).

Anhand der Kristallstruktur von BD1 im Komplex mit einem Histonpeptid konnte somit ein dualer Modus der Positionierung von Acetyllysin in der Bindungstasche der ersten Bromodomäne BD1 von Brd4 gezeigt werden: Einerseits interagiert ein polares Netzwerk von Wassermolekülen in der Bindungstasche mit dem Sauerstoff des Acetyllysins, dieser Sauerstoff wird zudem durch N140 gebunden. Andererseits wird die unpolare Methylgruppe des Acetyllysins über schwache hydrophobe Wechselwirkungen durch konservierte Reste der Bromodomäne positioniert.

Interaktion des N-Terminus von BD2 mit Nachbarmolekülen

Parallel zur Herstellung von BD1-Peptidkristallen wurden auch Kristalle von BD2 mit den Histonpeptiden versetzt. Dabei zeigte sich jedoch, dass während der 24-stündigen Inkubation die Kristalle instabil wurden. Daher wurde die Inkubationszeit reduziert und die Kristalle schon nach 1-2 Stunden aus der Peptidlösung entnommen. Diese Kristalle streuten

wie auch die unkomplexierten Kristalle bis zu einer Auflösung von 1,2 Å. Es wird hier der Datensatz des BD2 (349-464) Kristalls nach H3-K14(ac)-Inkubation betrachtet (Statistiken in Tabelle 6 im Anhang). Auch in der sonst unveränderten Struktur von BD2 zeigte sich zusätzliche Dichte in der Bindungstasche nahe des essentiellen N434 (N140 in BD1, Abbildung 40 A), jedoch entsprach die Form der Dichte nicht dem der verwendeten Peptide.

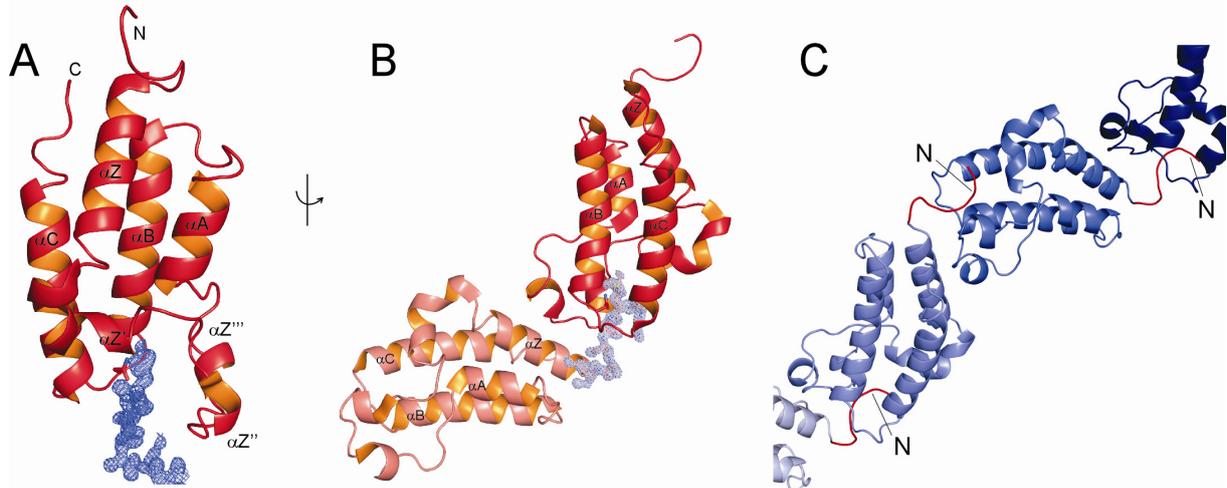


Abbildung 40: Kristallstruktur von BD2 nach der Inkubation mit H3-K14(ac)-Peptid. A) In der Bindungstasche von BD2 fand sich nach dem Versetzen mit Histonpeptiden zusätzliche Elektronendichte (dargestellt bei $1,0 \sigma$), die ausgeprägter erschien als im Fall von BD1. B) Die Bindung des N-Terminus eines Nachbarmoleküls im Kristall (rosa) in die Bindungstasche von BD2 (rot-orange) konnte anhand der Elektronendichte in der Bindungstasche ($1,0 \sigma$), welche zum Nachbarmolekül ausging, zugeordnet werden. C). Bei Darstellung mehrerer Nachbarmoleküle innerhalb der Kristallpackung wurde eine kettenartige Verbindung der Moleküle durch den Kristall sichtbar, bei der ein Molekül (blau) über seinen N-Terminus (rot) das nächste Molekül bindet.

Eine genaue Betrachtung ergab, dass sie nicht durch ein gebundenes Peptides gebildet wurde, sondern stattdessen von dem im Kristall benachbart-liegenden BD2-Molekül stammt, dessen N-Terminus in die Bindungstasche von BD2 hineinreicht (Abbildung 40 B). Eine erneute Analyse der unkomplexierten BD2 ergab zudem, dass auch hier der N-Terminus eines BD2-Moleküls in die Bindungstasche des benachbarten Moleküls bindet. Allerdings war in der unkomplexierten Form die Elektronendichte dieses N-Terminus deutlich schwächer ausgebildet als in der Peptid-inkubierten Form und deshalb nicht sofort als diese zu identifizieren. Da N-Terminus und die Bindungstasche auf zwei gegenüberliegenden Seiten des Moleküls liegen, erfolgte die Interaktion nicht als homomerer Kontakt in Form eines Dimes, sondern durch die Bindung des N-Terminus von einem BD2 in das Nachbarmolekül, welches seinerseits das nächste Molekül band. Dadurch bildeten sich innerhalb des BD2-Kristalls strangartige Strukturen, die den Kristall durchdrangen und vermutlich durch die dichte Packung und Stabilisierung der Bromodomänen zu der sehr hohen atomaren Auflösung des Kristalls von 1,2 Å beitrugen (Abbildung 40 C).

Die Betrachtung der Bindung des N-Terminus in die Bindungstasche von BD2 zeigte, dass nicht die natürlichen Aminosäuren von BD2 für die Bindung verantwortlich sind, sondern sich jene Reste in der Tasche fanden, welche aus der Erkennungssequenz der TEV-Proteaseschnittstelle hervorgegangen waren. Diese vier Aminosäuren G₋₄-A₋₃-M₋₂-G₋₁ ragen weit in die Bindungstasche hinein und positionieren sich nahe des N434, welches typischerweise die Bindung des Acetyllysins koordiniert. Die Position des Acetyllysins nimmt

stattdessen ein Methionin (M₂) ein, welches in zwei Konformationen mit N434 zugewandter und abgewandter Methylgruppe auftritt (Abbildung 41 A). Ein Vergleich der Positionierung des artifiziellen Methionins mit dem natürlichen Acetyllysin, wie es in der Struktur von Gcn5 zu finden ist (Owen et al., 2000), zeigte, dass die N-terminale Verbindungsregion über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff des N434 und dem Hauptkettenstickstoff des dem Methionin benachbarten Glycin (-1) in ihrer Position gehalten wird (Abbildung 41 B). Das Histonpeptid in Gcn5 wird dagegen von einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Seitenkettenstickstoff des Asparagins und einer indirekten Wasserstoffbrücke, vermittelt über ein konserviertes Wassermolekül, zwischen dem Sauerstoff des Asparagins und einem Stickstoff der Hauptkette des Peptids gebunden.

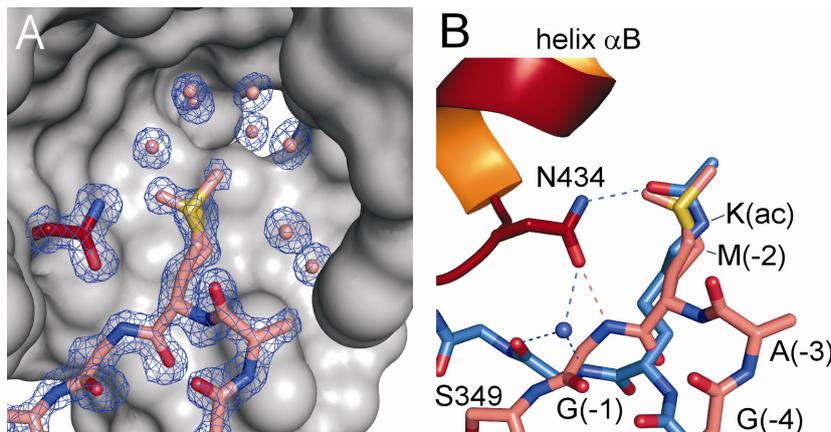


Abbildung 41: Bindung des N-Terminus von BD2 durch die Bindung der artifiziellen Verbindungssequenz. A) Die Struktur und Elektronendichte bei $1,0\sigma$ der Verbindungssequenz $G_4-A_3-M_2-G_1$ zeigen die Positionierung des Methionins in zwei Konformationen in der Tasche. B) Überlagerung der Position des N-Terminus und des H4-K16-Peptides aus Gcn5 (Owen et al., 2000).

Da durch die Interaktion der Verbindungssequenz mit der Tasche von BD2 im Kristall blockiert vorlag, wurde versucht, durch Varianz der Länge des N-Terminus von BD2 und dem Verdau durch SUMO-Protease, welche keine überstehenden Aminosäure zurücklässt, diese artifizielle Blockade der Tasche zu unterbinden. BD2-Konstrukte mit sukzessiven N-terminalen Verkürzungen erwiesen sich allerdings als unlöslich.

Untersuchung einer Oligomerisierung von BD2

Bei der Analyse der Kristallpackung in den BD2-Kristallen fiel als weiteres Detail auf, dass die Kristallpackung zwar aus einem Molekül pro asymmetrischer Einheitszelle bestand, die Moleküle benachbarter Einheitszellen sich jedoch zu Dimeren zusammenlagerten (Abbildung 42 A, oben). Dabei lagen sich die beiden Bromodomänen punktsymmetrisch gegenüber und bildeten eine Dimerisierungsoberfläche über ihre Helices α B und α C. Für die erste Bromodomäne BD1 von Brd2 war eine Dimerisierung zu einer doppelten Bromodomäne beschrieben worden, bei der die Bindungstaschen nahe beieinander eine kooperative Bindung an zwei acetylierte Lysinen auf einem Histon vermittelten (Nakamura et al., 2007). Da BD2 bei der Größenausschlusschromatographie im Vergleich zum Proteinstandard nicht bei seinem Molekulargewicht von 14 kDa, sondern bei etwa 21 kDa eluierte (Abbildung 29), wurde im Folgenden untersucht, ob BD2 außer im Kristall auch in Lösung als Dimer vorlag.

Zu diesem Zweck wurden in der potentiellen Dimerisierungsoberfläche im Kristall zwei Reste R445 und D449 identifiziert, die durch eine Salzbrücke die Dimerisierung vermittelten könnten (Abbildung 42 A). Ausgehend von dieser Beobachtung wurde eine Mutante von BD2

erstellt, in der R445 und D449 jeweils zu Alanin mutiert wurde, um die Salzbrücke zu unterbinden (R445A/D449A, dargestellt in grün in Abbildung 42 A, unten). Als weitere Mutante wurde A456 auf der Bindungsfläche der beiden Proteine zu einem wesentlich größeren Glutamin mutiert, um die Dimerisierung der Proteine sterisch zu unterbinden (A456Q, dargestellt in Abbildung 42 A unten in orange). Beide Mutanten wurden im Vergleich zum Wildtyp (wt) von BD2 durch Größenausschlusschromatographie untersucht (Abbildung 42 B). Sowohl BD2 (wt) als auch die A456Q-Mutanten eluierten unverändert bei einem apparenten Molekulargewicht von 21 kDa. Die Mutante R445A/D449 zeigte dagegen eine verkürzte Retentionszeit zu einer apparenten Masse von etwa 30 kDa und lieferte damit kein Anzeichen für die Auflösung eines Dimers. Diese Experimente weisen daher mehr auf ein in monomerer Form vorliegendes BD2 in Lösung.

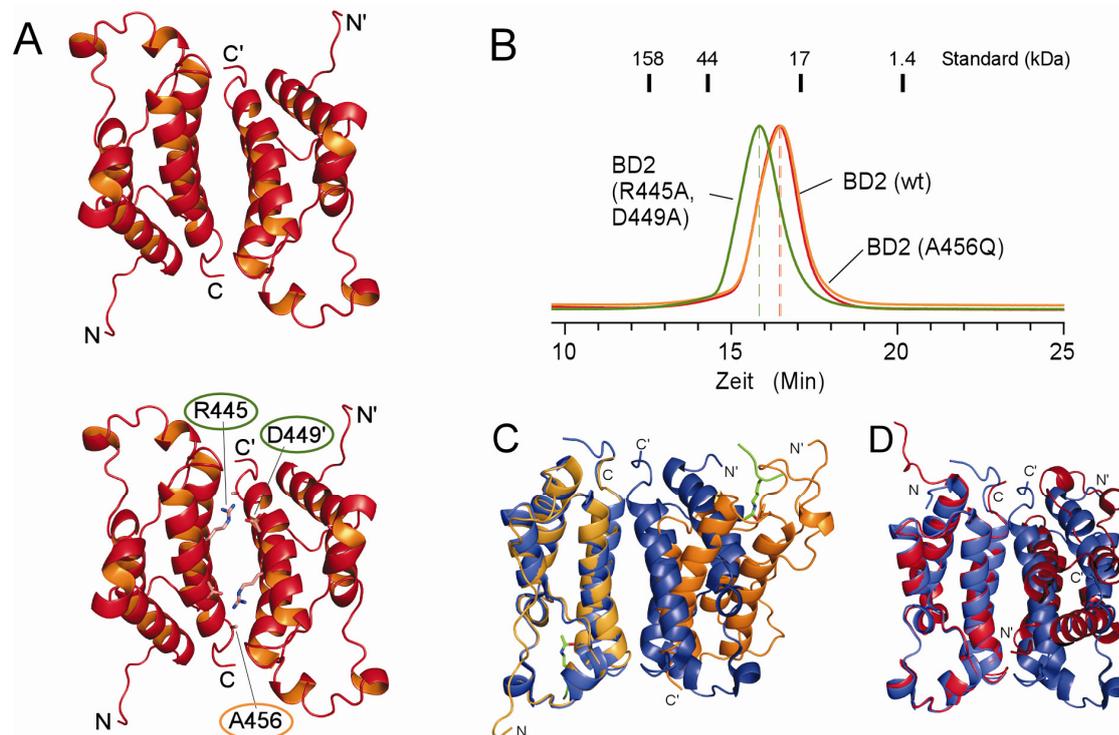


Abbildung 42: Untersuchung der Dimerisierung von BD2. A) Ein BD2-Dimer im Kristall wird über die Helices α B und α C vermittelt (oben). Die Mutante R445A/D449A sollte die Assoziation eines Dimers durch Ausbilden einer Salzbrücke zwischen den beiden BDs verhindern, die zweite Mutante A456Q wurden erstellt, um eine dimere Packung durch sterische Hinderung zu eliminieren (unten). B) A456Q zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp (wt) unveränderte Elutionszeit, während R445A/D449A eine verringerte Elutionszeit von 15,9 min aufwies. C) Überlagerung von BD1 aus Brd4 und einem im Kristall benachbarten Molekül mit einem Brd2 BD1-Dimer ließ keine Übereinstimmung in der Dimerisierung oder der Lage der Bindungstasche erkennen. D) Auch bei der Überlagerung von Brd4 BD2 und Brd2 BD1 wichen die kristallographischen Dimere stark voneinander ab.

Anhand der vorliegenden Strukturen wurde die Kristallstruktur des Brd2 BD1-Dimers (Nakamura et al., 2007) mit den Strukturen von BD1 und BD2 aus Brd4 aus der vorliegenden Arbeit verglichen. Dabei konnte weder eine Übereinstimmung der Positionen von Brd4 BD1 (Abbildung 42 C) noch von BD2 (Abbildung 42 D) im Kristall zu Brd2 BD1 gefunden werden: Während in der Brd2 BD1-Struktur die als Dimer angeordneten Bromodomänen spiegelbildlich angeordnet waren und die Bindungstaschen wie bei einer Tandem-Bromodomäne nahe beieinander lagen, zeigten die Bindungstaschen von Brd4 BD1 und

BD2 jeweils in unterschiedliche Richtungen und boten sich nicht zur kooperativen Bindung von mehreren Acetyllysinen eines Histons in geringen Abständen an. Daher wurde durch die beschriebenen Experimente eine Dimerisierung von BD2, wie sie für Brd2 BD1 beschrieben wurde, ausgeschlossen.

4.2.4 Analyse der Bindung von anderen Lysin- und Argininmodifikationen an Bromodomänen

Die Bindung der artifiziellen Verbindungssequenz in die Bindungstasche von BD2 (Abbildung 41) zusammen mit der Größe der Bindungstasche der BDs legte die Vermutung nahe, dass auch andere Histonsegmente, die kein Acetyllysin enthalten, an Bromodomänen binden könnten. Diese Hypothese sollte mit BD1 und BD2 strukturell und funktionell überprüft werden. Als Alternativen zu Acetyllysin wurden Aminosäuren verwendet, welche in ihrer Seitenkette ein Sauerstoffatom tragen, das die Bindung zu N140 (BD1) bzw. N434 (BD2) vermitteln könnte. Auch in ihrer verzweigten Struktur ähnelten sie Acetyllysin (Abbildung 43). Citrullin, welches als seltene Aminosäure in modifizierten Histonen gefunden werden kann, erfüllte diese Bedingungen. Citrullin wird durch die Deiminierung von Arginin durch Protein-Arginin-Deiminasen (PADIs) gebildet, bei der eine der Aminofunktionen durch Sauerstoff ersetzt wird (Vossenaar et al., 2003; György et al., 2006). Die Citrullierung wird als eine der Gegenreaktionen der Methylierung angesehen (siehe auch Einleitung unter 2.6.4, Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Im Vergleich zu Acetyllysin ist die Seitenkette von Citrullin um eine Methylengruppe verkürzt (Abbildung 43). Bis heute ist keine Erkennungsdomäne für Citrullin beschrieben, so dass im Folgenden untersucht wurde, ob Bromodomänen mit Citrullin interagieren können. Es wurde einerseits ein Peptid mit einer artifiziellen Bindungssequenz verwendet, bei dem in Analogie zum Peptid H3-K14(ac) die dritte Aminosäure (K14) in ein Citrullin (cit) verändert wurde (H3-K14(cit)). Ein weiteres Peptid orientierte sich an einer natürlich vorkommenden Citrullinposition auf Histon H4, bei der R3 zu Citrullin verändert ist (H4-R3(cit)).

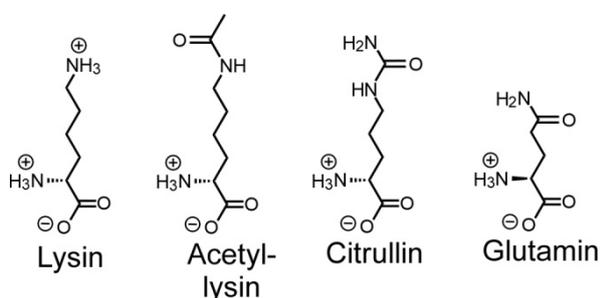


Abbildung 43: Mögliche alternative Bindungspartner für Bromodomänen. Als potentielle Alternative zu Acetyllysin wurden Citrullin und Glutamin getestet, da sie ebenso wie Acetyllysin über eine verzweigte Seitenkette mit einem Sauerstoffatom verfügen. Sie tragen jedoch einerseits eine zusätzliche Aminogruppe in der Verzweigung, andererseits sind sie um eine bzw. zwei Methylengruppen im Vergleich zu Acetyllysin verkürzt.

Als zweites alternatives Bindungsmotiv wurde die Aminosäure Glutamin ausgesucht. Ihre Seitenkette entspricht dem verzweigten Aufbau von Citrullin, jedoch ist die Seitenkette kürzer als Citrullin und enthält keine Amidgruppe. Brd4 enthält selbst eine Reihe von Glutaminen, die N-terminal zu BD1 liegen. Sollten diese BD1 binden und dadurch die Assoziation mit Histonsegmenten verhindern, könnte dies einen Mechanismus zur Regulation der

Bromodomänen darstellen. Daher wurde dieses Glutamin-reiche Motiv als Peptid zur Untersuchung der Erkennung durch Bromodomänen eingesetzt ((Brd4(33-38), Abbildung 43). Die drei Peptide H3-K14(cit), H4-R3(cit) und Brd4(33-38) wurden mit Kristallen von BD1 inkubiert und Röntgenbeugungsdatensätze in Auflösungen bis zu 1,5 Å aufgenommen und ausgewertet. In den ermittelten Strukturmodellen wurde innerhalb der Bindungstasche von BD1 nach zusätzlicher Dichte aus der Bindung der Peptide gesucht (Abbildung 44).

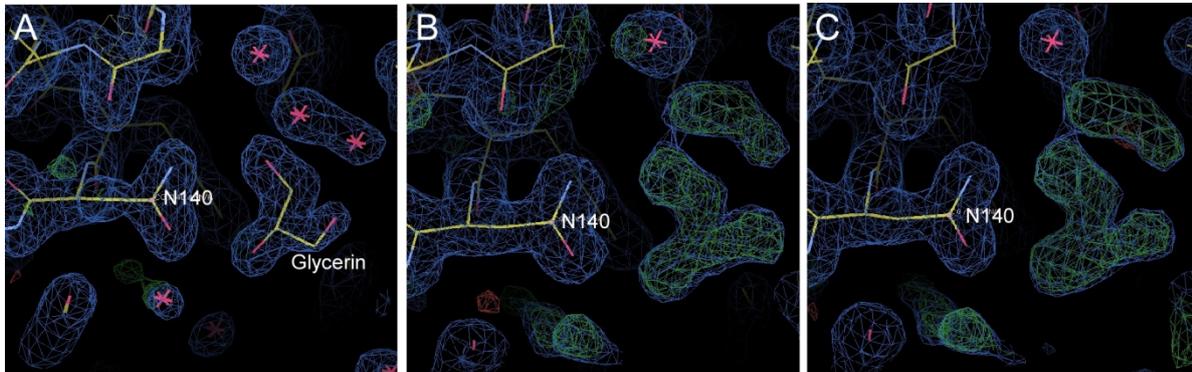


Abbildung 44: Elektronendichten der Kristallstrukturen nach Inkubation mit Nicht-Acetyllysinpeptiden. A) Elektronendichten der Bindungstasche von BD1 nahe N140 bei $1,0 \sigma$, welche ein Glycerin enthält. B) Nach Inkubation mit dem Citrullinpeptid H4-R3-(cit) konnte keine Veränderung der F_oF_c -Dichte in der Bindungstasche im Vergleich zur ungebundenen Struktur gefunden werden. C) Auch nach der Zugabe vom Glutaminpeptid Brd4 (33-38) zeigte sich nach N140 lediglich die F_oF_c -Dichte des Glycerins und zweier Wasser wie in A.

Beim Vergleich der Dichten innerhalb der Bindungstasche von BD1 mit den Elektronendichten der mit den Peptiden inkubierten Kristalle wurde jedoch klar, dass keine zusätzliche Dichte eines Peptides gefunden werden konnte, sondern lediglich die bereits zuvor beobachteten Wasser- und Glycerinmoleküle identifiziert wurden. Es konnte somit keine Bindung von Citrullin oder Glutamin in die Bindungstasche des BD1-Kristalls beobachtet werden.

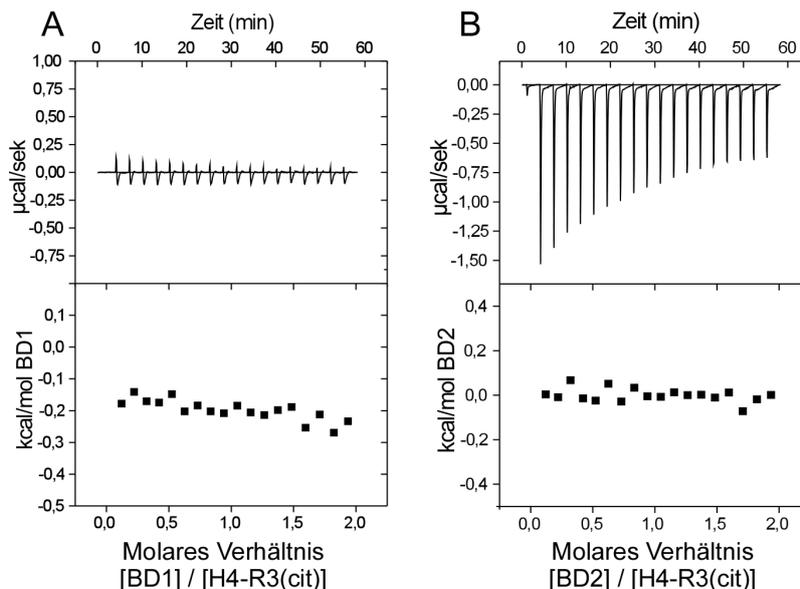


Abbildung 45: ITC-Messungen der Titration von Brd4-Bromodomänen zum Citrullinpeptid H4-R3(cit). A) Titration von 5,9 mM BD1 in 590 µM Peptid zeigte kein Anzeichen für eine Bindung bei 25°C. B) Titration von 6 mM BD2 in 600 µM Peptid zeigte deutliche Wärmetönung, die jedoch von der Titration des Proteins in den Puffer stammt und durch Subtraktion des Referenzspektrums eliminiert wurde. Es konnte somit keine Bindung beobachtet werden.

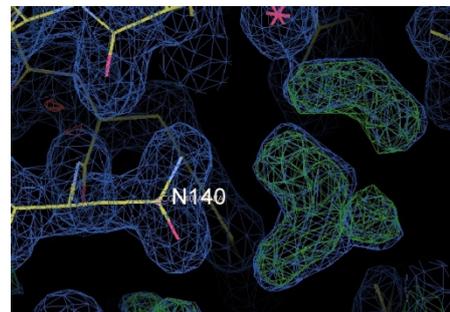
Parallel zu dieser kristallographischen Untersuchung wurden ITC-Messungen der drei Peptide mit BD1 und BD2 durchgeführt. Die in Abbildung 45 dargestellten ITC-Kurven von H4-R3(cit) mit BD1 und BD2 zeigen, dass bei der Titration von BD1 in die Peptidlösung keine

Wärmetönung als Zeichen für eine Bindung registriert wurde (BD1 in Puffer-Kontrolle in Abbildung 73 im Anhang).

4.2.5 Bindung von acetylierten CycT1-Peptiden an BD2

Während der Durchführung dieser experimentellen Arbeit wurde die Acetylierung von vier Lysinresten im zentralen Bereich 361-423 der P-TEFb-Untereinheit CycT1 beschrieben, wodurch eine Dissoziation der Inhibitoren Hexim1/7SK und somit die Aktivierung von P-TEFb erreicht wird (Cho et al., 2009). Zwar ist die Aktivierung von P-TEFb durch die Bromodomänen von Brd4 durch die Ergebnisse der Verdin-Gruppe (Bisgrove et al., 2007) sowie die unter 4.1.1 beschriebenen Resultate der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen worden, jedoch ist eine Interaktion zwischen den Bromodomänen von Brd4 und dem zentralen Bereich von CycT1 durchaus denkbar (Jang et al., 2005), wenn die Bromodomänen mit acetylierten Lysinen in CycT1 interagieren würden. Diese Art der Interaktion sollte durch ITC-Messungen mit zwei Peptiden überprüft werden, welche den Acetylierungsstellen K390 (CycT1-K390(ac)) und K404 (CycT1-K404(ac)) sowie deren Umgebung abgeleitet wurden (siehe 3.4). Auch die Lösung der Struktur des Peptidkomplexes mit BD1 anhand des vorliegenden Kristallisationssystems würde Aufschluss über eine potentielle Bindung sowie deren Mechanismen geben.

Abbildung 46: Elektronendichte der Bindungstasche von BD1 nach CycT1-K404(ac)-Zugabe. Die Elektronendichte von BD1 nach der Inkubation mit einem acetylierten CycT1-Peptid zeigte bei $1,0 \sigma$ keine neue $F_o - F_c$ -Dichte für das Acetyllysin des Peptid, sondern die Dichte in Form eines Glycerinmoleküls und zwei darüber gelagerter Wasser, wie sie auch in der freien BD1-Struktur auftreten.



Nach der Inkubation von BD1-Kristallen wurde aus den aufgenommenen Röntgenbeugungsdaten die Struktur des potentiellen Komplexes errechnet und verfeinert. Bei der Untersuchung der gelösten Struktur konnte jedoch keine Dichte eines Acetyllysins aus CycT1 in der Bindungstasche der Bromodomäne entdeckt werden. Lediglich die Dichte des Glycerinmoleküls und der zwei Wasser war deutlich ausgeprägt (Abbildung 46). Kristallographisch konnte somit keine Bindung der CycT1-Peptide nachgewiesen werden.

ITC-Messungen der CycT1-Peptide mit BD1 waren aufgrund der starken Präzipitation von BD1 während der Messung nicht möglich. Die Titration von BD2 in CycT1-K390(ac)- oder CycT1-K404(ac)-Lösungen lieferte jedoch eine deutliche Wärmetönung, die nach Integration und Anpassung der Kurve einen K_d von $110 \mu\text{M}$ für CycT1-K390(ac) und $319 \mu\text{M}$ für CycT1-K404(ac) lieferte (Abbildung 47 B und C). Die ermittelten ΔG° -Werte lagen hier im Rahmen der acetylierten Histonpeptide mit $-5,39$ bzw. $-4,76$ kcal/mol. Auch das molare Verhältnis der Bindungsreaktion lag mit $1,44$ und $1,84$ über dem einer 1:1-Bindung von $n=1$.

Die dargelegten Messungen belegen somit eine Interaktion der Bromodomänen von Brd4 mit Nicht-Histonpeptiden des zentralen Bereichs von CycT1 und könnten einen

zusätzlichen Aspekt der P-TEFb-Regulation durch Bindung von Brd4 an P-TEFb sowohl über CT als auch über die BDs darstellen.

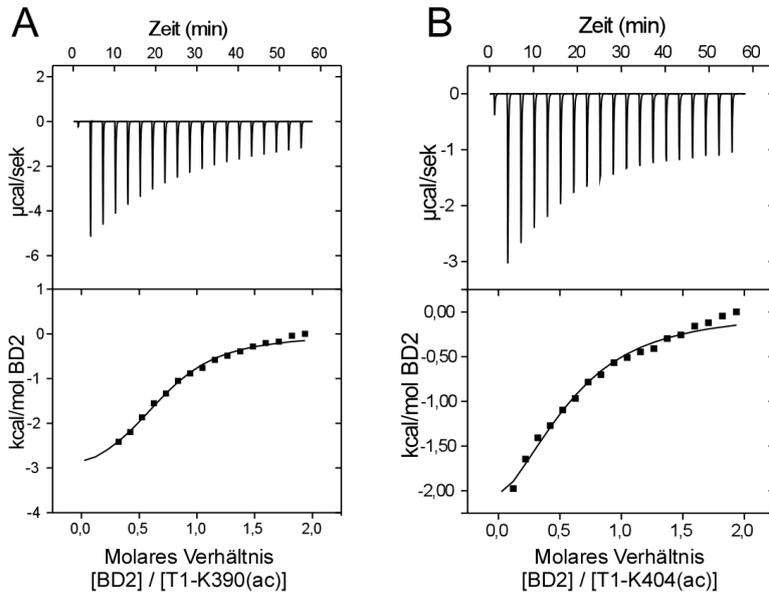


Abbildung 47: ITC-Messungen von BD2 gegen T1-Peptide. A) Die Titration von 6 mM BD2 gegen 600 μM T1-K390(ac) und B) BD2 gegen T1-K404(ac) zeigte in beiden Fällen eine deutliche Bindungskurve der Wärmetönungen von $-5 \mu\text{cal/sek}$ bzw. $-3 \mu\text{cal/sek}$. C) Auflistung der ermittelten thermodynamischen Parameter sowie der K_d 's und des molaren Verhältnisses n der beiden Reaktionen. Mit 110 und 319 μM liegen die K_d 's der Reaktionen im Bereich der Bindung von acetylierten Histonpeptiden (siehe Abbildung 36).

Titration	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	molares Verhältnis n
BD2 zu					
T1-K390(ac)	110	-2,35	3,04	-5,39	1,44
T1-K404(ac)	319	-1,69	3,07	-4,76	1,84

4.2.6 Bindung von erweiterten Acyllysineptiden an Bromodomänen

Nachdem Acetyllysin-ähnliche, jedoch verkürzte Aminosäuren wie Citrullin und Glutamin nicht mit Bromodomänen von Brd4 interagierten, sollten als Alternativen verlängerte Varianten von Acetyllysin als Erkennungsmotive für Bromodomänen untersucht werden. Die Verlängerung der Acylgruppe um eine Methyl- oder Ethylengruppe führt zu den hydrophoberen, modifizierten Aminosäuren Propionyllysin und Butyryllysin (Abbildung 48). Beide Moleküle sind in einer proteomischen Studie in den Histonen H3 und H4 von Mensch und Hefe gefunden worden (Chen et al., 2007; Zhang et al., 2009).

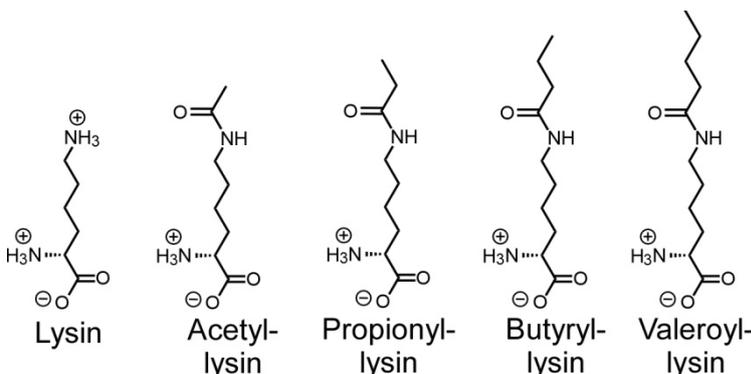


Abbildung 48: Erweiterte Modifikationen von Lysin. Durch die Acetylierung von Lysin wird die positive Ladung der Seitenkette der Aminosäure neutralisiert. Verlängerte Acylgruppen stellen Propionyllysin, Butyryllysin und Valeroyllysin dar, die eine, zwei oder drei Methylengruppen mehr enthalten und den hydrophoben Charakter der Aminosäuren weiter ausprägen.

Propionyl-CoA und Butyryl-CoA werden von HATs anstelle von Acetyl-CoA als Cofaktor akzeptiert und übertragen, genauso können beide Gruppen von HDACs auch wieder entfernt werden (Chen et al., 2007; Leemhuis et al., 2008; Smith und Denu, 2007). Dies wirft die Frage auf, ob Propionyllysine (K(prop)) und Butyryllysine (K(but)) auch von Bromodomänen erkannt werden könnten, da bisher keine alternative Proteindomäne gefunden wurde, die diese Modifikationen bindet. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden auf Grundlage des bereits charakterisierten Peptids H3-K14(ac) zwei Peptide H3-K14(prop) und H3-K14(but) ausgewählt, welche an Stelle des Acetyllysins ein Propionyl- bzw. Butyryllysine tragen. Zudem wurde die in menschlichen Zellen gefundene Propionylierungsstelle H3-K23(prop) als Grundlage eines weiteren Peptids ausgewählt. Als konsequente Weiterführung der Verlängerung von Acetyllysine (C2) zu Propionyl- (C3)- und Butyryllysine (C4) wurde zuletzt auch ein Peptid mit Valeroyllysine (C5) im H3-Histonkontext erstellt. Diese Peptide sollten im bestehenden System auf eine Bindung an die Bromodomänen hin getestet und ihre Interaktion gegebenenfalls in einer Kristallstruktur charakterisiert werden.

Affinitäten der Bindung von propionylierten und butyrylierten Peptiden an BDs

Erneut wurde ITC als Methode zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Bindung zwischen Peptiden und den Bromodomänen von Brd4 eingesetzt. Bei der Reinigung von BD2 traten jedoch erhebliche Löslichkeitsprobleme auf, die bei hohen Konzentrationen über 50 mg/ml eine Aggregation des Proteins auslösten. Daher wurde das Titrationsschema invertiert und die zu testenden Peptide in der Spritze vorgelegt und in BD2-Lösung titriert. Eine Kontrollmessung mit acetyliertem H4-K5(ac)-Peptid ergab vergleichbare thermodynamische Parameter wie die unter 4.2.3 aufgeführt und belegte, dass durch die Inversion die zu messenden Daten nicht beeinflusst wurden. Messungen von BD1 wurden wie auch zuvor beschrieben durchgeführt. Als Vergleich der Messergebnisse der propionylierten und butyrylierten Peptide zu acetylierten Peptiden wurden die unter 4.2.3 beschriebenen Messungen von BD1 und BD2 gegen das acetylierte H3-K14(ac)-Peptid ebenfalls in Abbildung 49 C aufgeführt.

In den ITC-Experimenten für die propionylierten Peptide des Histons H3 wurden Dissoziationskonstanten von 337 μM (K14(prop)) bzw. 380 μM (K23(prop)) bei der Interaktion mit BD1 bestimmt. Die ermittelten Werte der Gibb'schen freien Enthalpie ΔG^0 lagen mit -4,7 und -4,6 kcal/mol um etwa 0,7 kcal/mol höher als für das acetylierte Peptid K14(ac). Die Affinität der propionylierten Peptide zu BD1 war somit geringer als bei dem H3-K14(ac)-Peptid (118 μM). BD2 zeigte zu den propionylierten Histonfragmenten leicht höhere Affinitäten von 213 und 208 μM (Abbildung 49 A). Damit war für BD2 eine leichte Steigerung der Affinitäten erkennbar.

Die Stöchiometrien n der gemessenen Bindungen lagen im Gegensatz zu vorherigen Messungen mit acetylierten Peptiden mit einem $n=0,9-1,0$ im Bereich einer 1:1-Bindung und entsprachen damit der im Falle von Acetyllysine per Kristallstruktur nahegelegten Stöchiometrie. Die zusätzliche Methylengruppe des Propionyllysins scheint somit nur einen geringen Einfluss auf die Affinität zu Bromodomänen zu haben. (Abbildung 49).

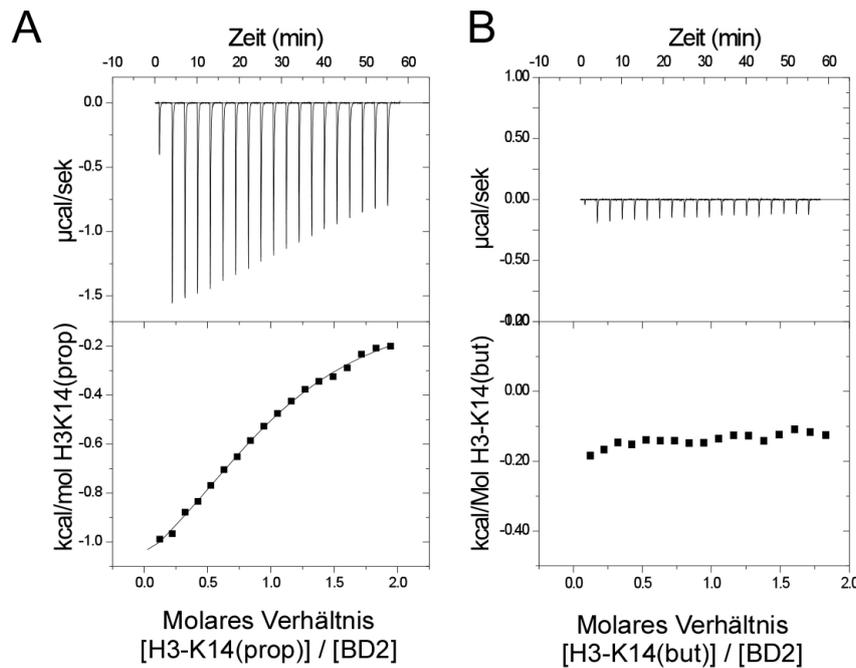


Abbildung 49: ITC-Messungen der Interaktion von propionylierten und butyrylierten Histonpeptiden mit BD1 und BD2. A) Titration von 5 mM H3-K14(prop) zu 500 µM BD2 bei 25°C zeigte Wärmetönungen von bis zu -1,5 µcal/sek. B) ITC-Messung von 5 mM butyryliertem H3-K14(but)-Peptid gegen 500 µM BD2 zeigte keine Bindung. C) Auflistung der gemessenen und errechneten Parameter der Titrations von BD1 und BD2 gegen acetylierte, propionylierte und butyrylierte Peptide.

Titration	K _d (µM)	ΔH (kcal/mol)	TΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	molares Verhältnis n
BD1 zu					
H3-K14(ac)	118	-0,59	4,77	-5,36	1,33
H3-K14(prop)	337	-0,64	4,08	-4,72	0,93
H3-K23(prop)	380	-0,64	4,02	-4,66	1,06
H3-K14(but)	-	-	-	-	-
Peptid zu BD2					
H3-K14(ac)	327	-1,68	3,07	-4,75	2,31
H3-K14(prop)	213	-1,48	3,52	-5,00	1,00
H3-K23(prop)	208	-0,86	4,17	-5,03	0,96
H3-K14(but)	-	-	-	-	-

Im Gegensatz zu den propionylierten Peptiden konnte für die Peptide, welche anstatt des H4-K14(ac)-Acetyllysins ein Butyryllysins beinhalten, keine Bindung in den ITC-Messungen zu BD1 oder BD2 nachgewiesen werden (Abbildung 49 B). Dies deutet auf eine Minderung der Bindungsfähigkeit von Butyryllysinspeptiden durch die weitere Methylengruppe im Vergleich zur Propionylseitenkette hin.

Strukturen der Komplexe von propionylierten und butyrylierte Peptiden mit Brd4 BD1

Obwohl nur für die beiden propionylierten Peptide H3-K14(prop) und H3-K23(prop) eine Bindung an BD1 nachgewiesen werden konnte, wurden sowohl die propionylierten Peptide als auch das butyrylierte Peptid H3-K14(but) für 24 Stunden in 20-fachem Überschuss zu Brd4 BD1-Kristallen gegeben. Röntgendiffraktionsdatensätze der Kristalle wurden prozessiert und unter Verwendung der Koordinaten und Phasen der ungebundenen Struktur von BD1 verfeinert (Tabelle 3).

Bei Betrachtung der Bindungstasche fand sich überraschenderweise sowohl in den Komplexstrukturen der propionylierten Peptide als auch der butyrylierten Peptide zusätzliche

Elektronendichte, in welche nach Verfeinerung das entsprechende Propionyllysine oder Butyryllysine eingepasst werden konnte. Diese unterschieden sich deutlich von der unter 4.2.3 beschriebenen Dichte eines Acetyllysins, da sowohl die zusätzliche Methylgruppe des Propionyllysins als auch die zusätzliche Ethylgruppe des Butyryllysins eindeutig sichtbar waren (Abbildung 50). Das Wassernetzwerk oberhalb des Peptids war in beiden Fällen unbeeinträchtigt und entsprach dem in der BD1-Struktur, die im Komplex mit dem acetylierten Liganden gefunden wurde und die Bindungstasche auskleidet.

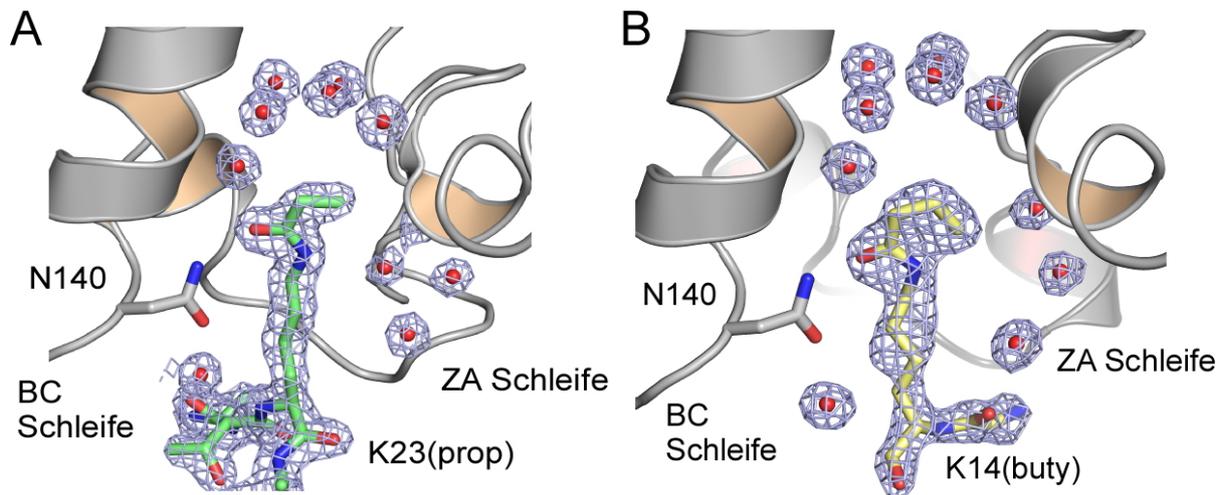


Abbildung 50: Struktur und Elektronendichte der propionylierten und butyrylierten Peptide in der BD1-Tasche. A) Das Propionyllysine des Peptids H3-K23(prop) in grün konnte in der Bindungstasche von BD1 klar von Acetyllysine durch die zusätzliche Methylgruppe unterschieden werden, die in der Elektronendichte bei $1,0 \sigma$ identifiziert wurde. B) Die Elektronendichte bei $1,0 \sigma$ des Peptids H3-K14(buty) zeigte die Konformation des Butyryllysins (gelb) in der Bindungstasche.

Der Vergleich der beiden Strukturen mit propionylierten Histonsequenzen zeigte, dass die Elektronendichte des Peptids H3-K23(prop) trotz geringerer Auflösung ($1,75 \text{ \AA}$) wesentlich deutlicher und ausgeprägter erschien als im Fall von H3-K14(prop) mit $1,55 \text{ \AA}$. Daher wurde diese repräsentativ für die beiden Propionyllysinepeptide verfeinert und analysiert. Die Struktur von BD1 in seiner H3-K23(prop)-gebundenen Form wurde zu R-Faktoren von 17,2% (R_{fact}) bzw. 21,9% (R_{free}) verfeinert und enthielt neben einem Ethylglykollmolekül auch 151 Wasser. In dieser Struktur konnten neben dem Propionyllysine in der Bindungstasche noch zwei N-terminale und vier C-terminale Reste des Peptids in die vorhandene Elektronendichte eingefügt werden. Bei den unter 4.2.3 beschriebenen Acetyllysinepeptiden konnten maximal vier Aminosäuren des Oktapeptids identifiziert werden, im Fall von H3-K23(prop) wurden dagegen sieben der acht Reste zugeordnet. Auf diese Reste wird später genauer eingegangen. In Abbildung 50 A ist die Struktur von BD1 mit gebundenem propionyliertem Peptid aufgeführt, zur besseren Einsicht in die Bindungstasche wurde die Bromodomäne ohne α C-Helix dargestellt. Wie schon bei der Komplexstruktur von BD1 und H3-K14(ac) wird das gebundene Peptid durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem η -Sauerstoff des Propionyllysins und der Aminogruppe der Seitenkette von N140 unterhalb des konservierten Wassernetzes positioniert. Die zusätzliche Ethylgruppe an der Verzweigung des propionylierten Lysins zeigt jedoch nicht den Wassern entgegen ins Innere der Bindungstasche, sondern ist nach außen geknickt zum Ausgang der Tasche.

Tabelle 3: Parameter der Röntgenbeugungsexperimente und Strukturlösung von Brd4 BD1 mit propionyliertem oder butyryliertem H3-Peptid.

	Brd4 BD1 mit H3-K23(prop)	Brd4 BD1 mit H3-K14(but)
Datenaufnahme		
Wellenlänge [Å]	1,00	0,978946
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle a, b, c [Å] α, β, γ [°]	a=36,21, b=47,00, c=78,10 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=34,00, b=47,23, c=77,98 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Auflösung [Å]*	19,60 – 1,75 (1,8-1,75)	19,60 – 1,65 (1,7-1,65)
Gemessene Reflektionen*	53 560 (4 276)	61 824 (5 218)
Einzigartige Reflektionen*	13 605 (1072)	15 640 (1 309)
R _{merge} [%]*	8,6 (53,2)	8,0 (50,2)
Multiplizität*	3,9 (4,0)	4,0 (4,0)
$\langle I/\sigma_I \rangle$ *	20,1 (4,2)	20,8 (4,1)
Vollständigkeit [%]*	99,7 (100,0)	99,5 (98,8)
Modellverfeinerung/Refinement		
Gesamtzahl der Atome	1230	1202
Inhalt des Modells	mol A: MG- S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 H3 Peptid (AT K(prop) AARK), 1 EG 151 Wasser	mol A: MG- S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 H3 Peptid (G K(but)) 1 EG 135 Wasser
Anzahl der Wassermoleküle	151	135
Lösungsmittelanteil (%)	42	40
R _{factor} (%)*	17,2 (23,3)	17,7 (23,3)
R _{free} (%)*	21,9 (25,4)	22,5 (27,6)
rms der Bindungen [Å]	0,023	0,028
rms, der Winkel [Å]	1,936	1,195
$\langle B \rangle$ Gesamtz [Å ²]	27,9	19,9
Ramachandran plot	begünstigt : 96,1%	begünstigt : 96,8%
	erlaubt :3,9%	erlaubt :3,2%

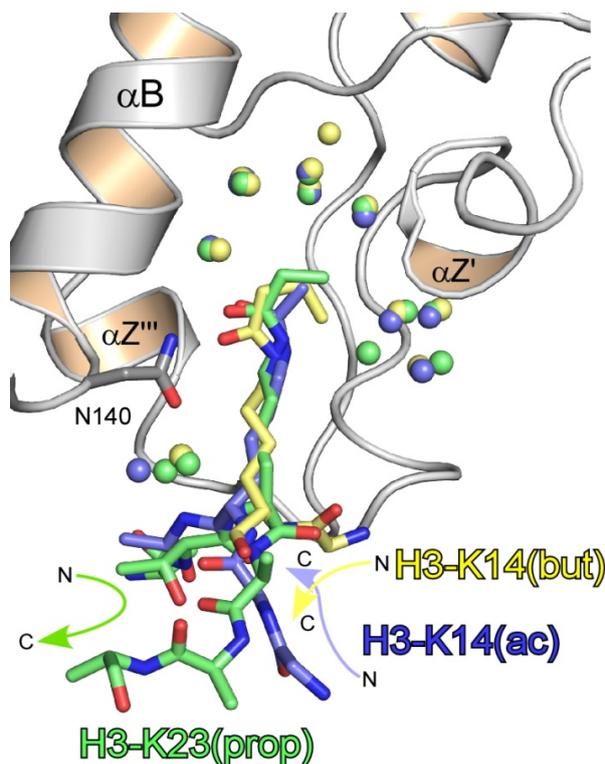
Auch in der Komplexstruktur von BD1 mit einem butyrylierten Peptid H3-K14(but), welche bei einer Auflösung von 1,65 Å nach Verfeinerung R-Faktoren von 17,7% (R_{fact}) bzw. 22,5% (R_{free}) aufwies, wird das Acyllysin über eine Wasserstoffbrücke des η-Sauerstoffs zu N140 gebunden. Die zusätzliche Butyrylgruppe zeigt jedoch nicht, wie in Abbildung 48 vorgeschlagen, direkt von der Verzweigung der Seitenkette weg, sondern knickt ab, um somit von den Wassern der Bindungstasche weg und in Richtung Taschenausgang zu deuten (Abbildung 50 B). Bei diesem Peptid konnten die restlichen Aminosäuren um das Butyryllysin nicht identifiziert werden, und es wurden lediglich das butyrylierte Lysin sowie ein N-terminales Glycin eingebaut. Eine Verbesserung der Auflösung des butyrylierten Peptids konnte auch durch Zugabe geringerer Mengen (10-facher Überschuss) oder höherer Mengen (30-facher Überschuss) des butyrylierten Peptids nicht erreicht werden. Daher wurde die vorliegende Struktur (20-facher Überschuss) ausgewertet und in dieser Arbeit dargestellt. Der Datensatz mit in geringerer Menge eingesetztem Peptid legt jedoch eine gegenseitige Verdrängung von Glycerin und Peptid in der Bindungstasche nahe, da sich

Elektronendichte beider Komponenten zu überlagern schienen. Dies könnte bei angenommener 95%-iger Besetzung von H3-K14(but) im Kristall mit 5%-iger Glycerinbesetzung die vergleichsweise schlechte Auflösung des Peptids, besonders des Kettenverlaufs, erklären.

Eine Komplexierung von BD1 mit dem noch weiter verlängerten Valeroyllysinpeptid im Kristall war jedoch nicht möglich, der Röntgenbeugungsdaten eines mit dem Peptid H3-K14(val)-versetzten Kristalls (Auflösung von 1,7 Å) zeigte keine zum Peptid gehörende Dichte in der Bindungstasche. Zwar schien eine leichte Verbreiterung der Dichte von Glycerin, welches sich in der unbesetzten Form in der Tasche findet, vorzuliegen, jedoch könnte dies höchstens auf eine partielle Besetzung der Bindungstasche durch das Peptid von 10-20% hindeuten. Da jedoch die Elektronendichte des Glycerins überwog, konnte keine eindeutige Bestätigung der Bindung von Valeroyllysin an BD1 getroffen werden, und es muss angenommen werden, dass das Valeroyllysinpeptid nicht an BD1 bindet.

Vergleich der Strukturen von Acetyl-, Propionyl- und Butyryllysin-Peptiden in BD1

Oberflächlich betrachtet unterscheiden sich die Strukturen der drei Modifikationen von Lysin (Acetyl-, Propionyl- und Butyryllysin) in der Bindungstasche von BD1 kaum. Eine Überlagerung der Strukturen sollte einen direkten Vergleich der Lage der Reste ermöglichen und potentielle Unterschiede aufzeigen. Die Überlagerung der Positionen der drei Lysinmodifikationen in der Bindungstasche von BD1 zeigt eine grundsätzlich übereinstimmende Position der Reste in der Bindungstasche, besonders deutlich kann die Übereinstimmung der Position des η -Sauerstoffs des Acetyllysin (blau) und des Propionyllysin (grün) beobachtet werden (Abbildung 51). Der η -Sauerstoff des Butyryllysin (gelb) liegt etwas tiefer, damit jedoch auch etwas näher an der Aminogruppe des N140. Durch dieses Absenken des η -Sauerstoffs wird die Butyrylgruppe der Verzweigung des butyrylierten Lysins weiter in die Tasche gezogen und nimmt den gleichen Raum ein wie die Methylgruppe des Acetyllysin



und der Propionylgruppe des H3-K23(prop)-Peptids. Gleichzeitig wird durch diese leichte Absenkung des Butyryllysin der Winkel vom η -Sauerstoff des Butyryllysin relativ zu N140 verändert, wodurch die Wasserstoffbrückenbildung beeinträchtigt werden könnte.

Abbildung 51: Überlagerung der Strukturen von acetylierten, propionylierten und butyrylierten Histonpeptiden in BD1. Die drei untersuchten Peptide der Komplexstrukturen mit Acetyl- (blau), Propionyl- (grün) und Butyryllysin (gelb) zeigen eine überlappende Positionierung der Kopfgruppe über den η -Sauerstoff, welches mit der Aminogruppe von N140 interagiert. Die Peptidhauptketten verlaufen voneinander abweichend, wie durch Pfeile (N nach C-Terminus) gekennzeichnet wurde. Die Positionen der Wassermoleküle sind in den drei Strukturen erhalten, wenngleich sie außerhalb der inneren Bindungstasche eine gewisse Abweichung voneinander zeigen. Zur besseren Einsicht der Struktur wurde K23 nicht dargestellt.

weicheung voneinander zeigen. Zur besseren Einsicht der Struktur wurde K23 nicht dargestellt.

Somit nehmen trotz leichter Abweichungen des koordinierenden η -Sauerstoffs das Methyl der Acetylverzweigung und deren Verlängerungen denselben Raum innerhalb der Bindungstasche ein, ohne dadurch die in der Tasche liegenden Wasser zu beeinflussen. Das in der Überlagerung der Peptidstrukturen ebenfalls dargestellte Wassernetzwerk überlagert sich gut und unterstreicht erneut die hohe Stabilität dieses Netzwerkes. Die Wasser oberhalb des Peptids weichen dabei kaum von ihrer Position ab, die Wasser nahe der kurzen $\alpha Z'$ -Helix zeigen eine leichte Varianz. Die Struktur von H3-K23(prop) enthielt an dieser Stelle ein zusätzliches Wassermolekül, welches in den anderen Strukturen nicht auftritt.

Der Vergleich der gesamten Seitenketten der Lysinmodifikationen zeigen dagegen eine deutliche Abweichung in den Positionen der C_{α} -Atome und der Laufrichtung der restlichen Aminosäuren der Histonfragmente. Sowohl das acetylierte (blau) als auch das propionylierte (grün) Peptid verlaufen quer zu N140, jedoch in entgegengesetzter Richtung bezüglich N- und C-Terminus (verdeutlicht durch eingezeichnete Pfeile). Das butyrylierte Peptid (gelb) dagegen liegt um 90° gedreht in der Tasche, sein N-Terminus ist dabei N140 abgewandt. Trotz dieser Varianz ist das koordinierende Wasser, welches im Falle des acetylierten Peptids H3-K14(ac) eine indirekte Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff des N140 und einem Hauptkettenstickstoff der nächsten Aminosäure des Peptids vermittelt, in allen Strukturen erhalten. Jedoch kann es nur für das Acetyllysinpeptid die koordinierende Funktion ausführen, in den anderen Strukturen geht es allein die Wasserstoffbrücke zum N140 ein, da kein Hauptkettenstickstoff an dieser Position für eine Bindung zur Verfügung steht.

Nachdem keine der beiden kurzen Acylkettenmodifikationen das Wassernetzwerk beeinträchtigen oder gar durchbrechen konnte, wurden auch die hydrophoben Interaktionen der Peptide mit BD1 auf Abweichungen hin untersucht. Die Positionen der hydrophoben Reste in den Bromodomänen der drei Strukturen zeigen keine herausstechenden Abweichungen, daher wurde die Positionierung des Propionyl- bzw. Butyryllysin im Verhältnis zu den zuvor beschriebenen hydrophoben Resten analysiert (Abbildung 52). Es zeigte sich, dass Propionyl- bzw. Butyryllysin wie auch das zuvor untersuchte acetylierte Lysin seitlich durch I149 und V87 koordiniert werden. Dabei stimmen durch die Planarität der Verzweigung die Abstände zu den seitlich positionierten hydrophoben Interaktionspartner bis auf $0,1 \text{ \AA}$ überein (Abbildung 52). Durch die leichte Neigung des Butyryllysin zu N140 scheint jedoch die Butyrylgruppe weniger optimal zu P82 und F83 (PF-Motiv) positioniert zu sein. Während im Fall von Propionyllysin sowohl die Methylen- als auch die endständige Methylgruppe von diesem parallel stehenden PF-Motiv hydrophob stabilisiert werden können (Abbildung 52 A), ist das Butyryllysin leicht zu N140 gekippt, um annähernd denselben Raum wie Acetyl- und Propionyllysin einzunehmen (Abbildung 52 B). Dadurch ist es jedoch ungünstiger zur Ausbildung hydrophober Kontakte durch das PF-Motiv gelagert, da es nicht wie Propionyllysin parallel zu den Resten steht, sondern eine Zwischenposition einnimmt. Dies bewirkt eine Schwächung der hydrophoben Interaktion zwischen der Butyrylgruppe und dem PF-Motiv, da die Entfernungen der hydrophoben Gruppen um $0,2 \text{ \AA}$ (F83) und $0,6 \text{ \AA}$ (P82) verlängert wurden. Die Neigung des butyrylierten Lysins hat auch eine leichte Annäherung des η -Sauerstoffs zur Aminogruppe von N140 zur Folge.

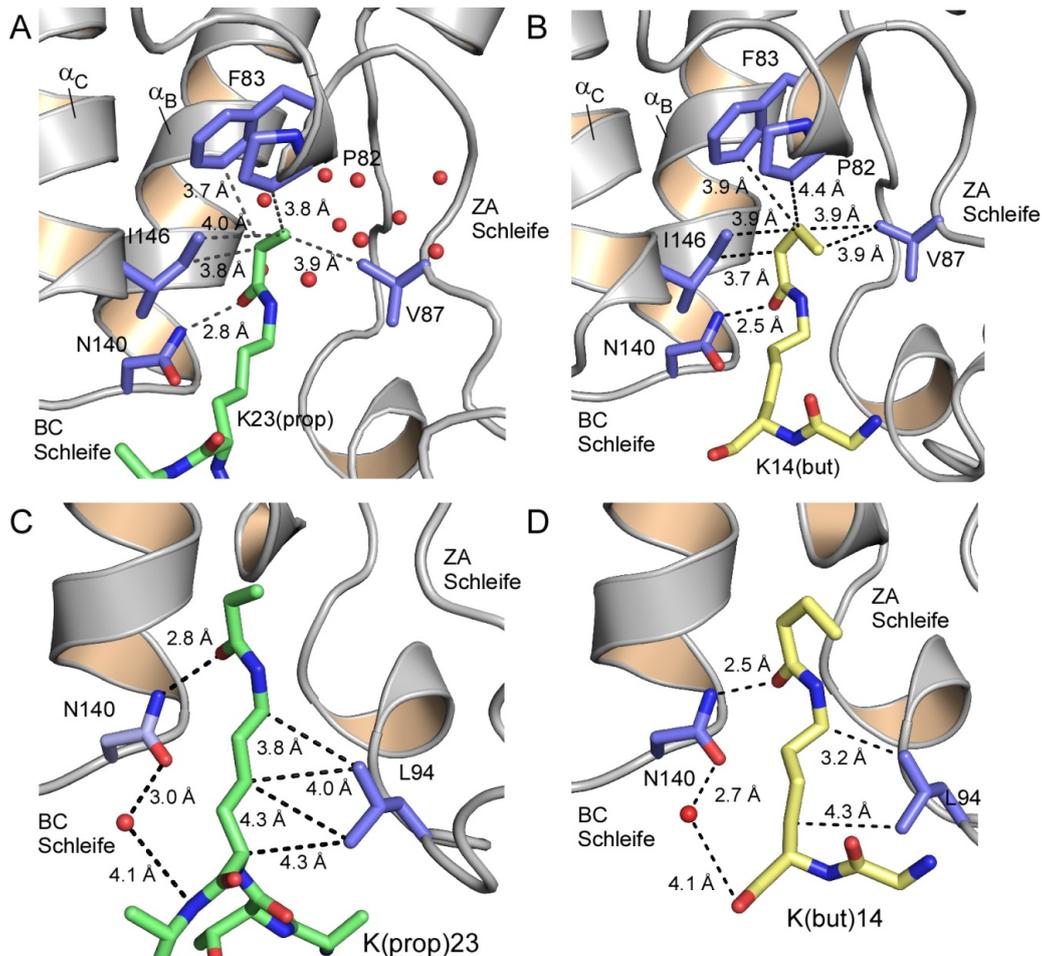


Abbildung 52: Hydrophobe Positionierung der modifizierten Lysine in der Bindungstasche. A) Das Propionyllysine des H3-K23(prop)-Peptids wird neben dem essentiellen N140 durch hydrophobe Wechselwirkungen zu I146 und L146 gebunden. Auch ein konserviertes PF-Motiv aus P82 und F83 interagiert mit dem modifizierten Peptid. B) Das butyrylierte Lysin des H3-K14(but)-Peptids ist dagegen im Vergleich zum Propionyllysine leicht gekippt in der Tasche, wodurch sich die hydrophoben Interaktionen zum PF-Motiv verlängern. C) Propionyllysine kann durch hydrophobe Wechselwirkungen mit L94 im Eingangsbereich der Bindungstasche über drei Methylengruppen optimal positioniert werden. D) Die Seitenkette von Butyryllysine zu L94 ist dagegen weniger optimal für hydrophobe Kontakte ausgerichtet.

Ein deutlicher Unterschied zeigt sich im Verlauf der Seitenkette von Propionyllysine und Butyryllysine: Während Propionyllysine durch seine gradlinig-verlaufende Seitenkette über vier hydrophobe Wechselwirkungen an drei Methylengruppen mit L94 interagieren kann (Abbildung 52 C), ist die Kette des Butyryllysins abgelenkt und kann nur zwei hydrophobe Wechselwirkungen eingehen (Abbildung 52 B). Möglicherweise sind diese Einschränkungen der hydrophoben Kontakte verantwortlich für die deutlich verringerte Affinität des butyrylierten Peptids zu den Bromodomänen.

Koordination der Peptidkette von H3-K23(prop) durch BD1

Die Struktur von BD1 im Komplex mit dem H3-K23(prop)-Peptid zeichnete sich durch eine exzellente Auflösung von sieben der acht Aminosäuren des Peptids aus. Selbst die äußerste sichtbare Aminosäure K27 ist mitsamt Seitenkette in der Elektronendichte sichtbar (Abbildung 54 A) und konnte eindeutig identifiziert werden, während in den Strukturen von H3-K14(ac) und H3-K14(but) lediglich 1-2 weitere Reste vor oder nach dem modifizierten

Lysin aufgelöst waren. Bei Betrachtung der Oberfläche von BD1 wird deutlich, dass dies nicht nur auf der Interaktion zwischen N140 und dem Propionyllysin beruht, sondern auch andere Reste wie K27 des Peptids mit BD1 interagieren. Dabei scheinen die positive Ladungen von basischen Aminosäuren auf der BD1-Oberfläche eine Rolle zu spielen (Abbildung 54 B), die – wie folgend beschrieben - einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion mit dem Peptid hatten. Eine genauere Betrachtung zeigte drei weitere Interaktionsstellen des Peptids mit der Bromodomäne: Der Lysinrest und das C_α-Atom des Propionyllysins werden durch hydrophobe Interaktion von dem konservierten L94 stabilisiert. L94 interagiert zusammen mit dem benachbarten P95 auch mit der Methylgruppe des N-terminalen Alanins des Peptids (Abbildung 54 C). Neben dieser hydrophoben Koordinierung wird A21 zusätzlich durch elektrostatische Interaktionen zwischen D96 und Y193 und der Carbonylgruppe des Alanins in seiner Position stabilisiert (Abbildung 54 E). Während diese Interaktionen nahe an der Bindungstasche der Bromodomäne erfolgen, wird K27 von zwei Resten der äußeren BC-Schleife gebunden (Abbildung 54 D).

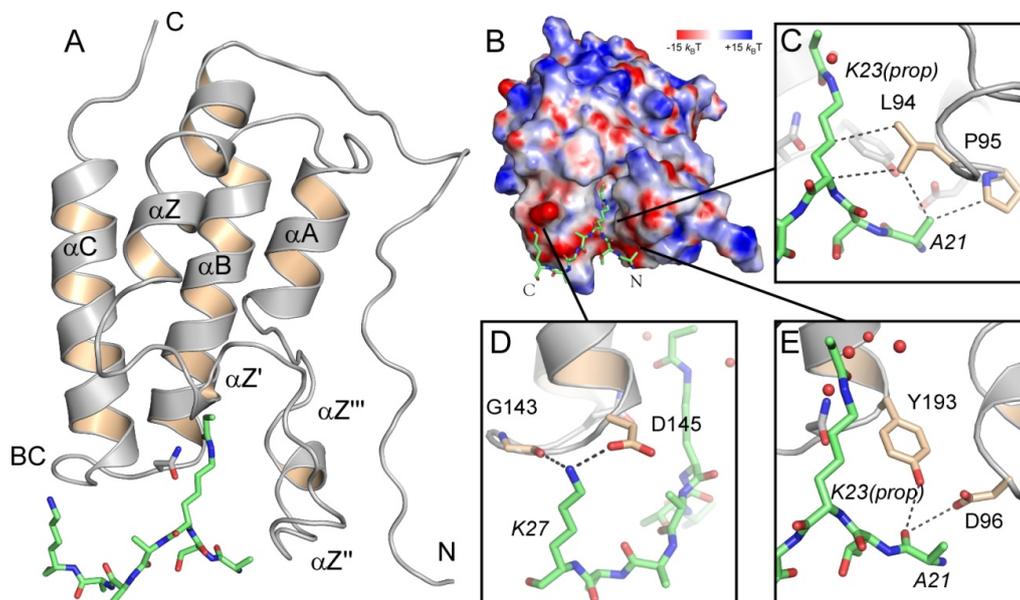


Abbildung 54: Interaktionen des propionylierten H3-K23(prop)-Peptids mit BD1. A) Im Strukturmodell des BD1-H3-K23(prop)-Komplexes konnten sieben Aminosäuren des Oktapeptids zugeordnet werden. B) Neben der Bindung des Acetyllysins spielen auch elektrostatische Interaktionen zwischen BD1 und dem Peptid eine Rolle, so beispielsweise ein negativ-geladener Bereich der BC-Schleife. Die elektrostatische Oberflächenladung von BD1 ist von $-15 k_B T$ (rot) bis $15 k_B T$ (blau) eingefärbt. C) Hydrophobe Interaktionen, ausgehend von L94, stabilisieren die Seitenkette des Propionyllysins und positionieren zusammen mit P95 das C-terminale A21 des Peptids. D) K27 wird durch Ausbildung einer Salzbrücke zu D145 sowie der Carbonylgruppe von G143 koordiniert. E) A21 wird zudem durch die Seitenketten von Y193 und D96 gebunden.

Die positiv geladene Aminogruppe der Seitenkette des Lysins wird dabei über zwei Salzbrücken durch Sauerstoffe in der Seitenkette von D145 und des Carbonylsauerstoffes von G143 koordiniert. Durch die Stabilisierung der Seitenkette über diese Interaktion durch K27 und Propionyllysin K(prop)23 erklärt sich auch die ausgesprochen gute Auflösung der restlichen Aminosäuren des Peptids sowie der definierte Richtungsverlauf. Das dem K27 folgende, C-terminale Serin dagegen ist nicht in der Elektronendichte aufgelöst, vermutlich aufgrund von fehlender Stabilisierung durch Bindung an BD1.

4.2.7 Vergleichende Analyse der Bindung eines doppelt-acetylierten Peptids an BD1 und BD2

Vor kurzem ist über die Bindungen von mehrfach-acetylierten Histonpeptiden an die Bromodomänen des Brd4-verwandten Proteins BrdT berichtet worden. Dabei wurde eine verbesserte Affinität eines doppelt-acetylierten H4-Peptids (H4-K5(ac)K8(ac)) aus 12 Resten mit einem K_d von 22 μM zur ersten Bromodomäne BD1 von BrdT ermittelt (Morinière et al., 2009). Diese verstärkte Bindung schien spezifisch für BD1 von BrdT, aber nicht BD2 zu sein. Zusätzlich war die Co-Kristallstruktur von BrdT BD1 im Komplex mit dem doppelt-acetylierten Peptid H4-K5(ac)K8(ac) beschrieben worden. In dieser Struktur band K5(ac) über eine Wasserstoffbrücke an das konservierte Asparagin in der Bindungstasche, während das zweite Acetyllysin K8(ac), dem K5(ac) zugeneigt, ebenfalls in die Bindungstasche deutet (Abbildung 55).

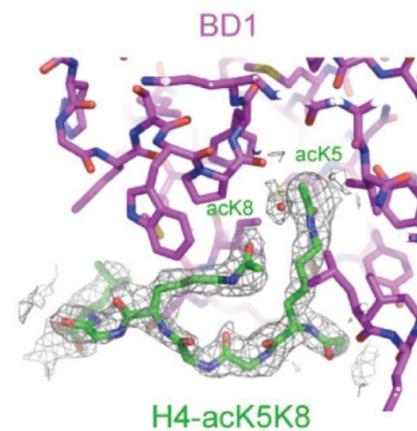


Abbildung 55: Struktur von BrdT BD1 mit doppelt-acetylierten Histonpeptid H4-K5(ac)K8(ac). Die Kristallstruktur von BrdT BD1 mit H4-K5(ac)K8(ac) bei 2,4 Å zeigt die Bindung eines Acetyllysin K5(ac) über das konservierte Asparagin, während das andere K8(ac) seitlich in die Tasche zum anderen Acetyllysin ragt. Die Elektronendichte zur Rechtfertigung des Modells wurde bei 1,8 σ dargestellt (Morinière et al., 2009).

Da Proteine der BET-Familie untereinander hochkonserviert sind, könnte eine solche Bevorzugung von BD1 gegenüber BD2 bei Verwendung eines doppelt-acetylierten Peptids übertragbar auf andere Brd-Proteine wie Brd4 sein. Aus diesem Grund wurde das beschriebene Peptid auf seine Bindungseigenschaften an BD1 und BD2 von Brd4 hin getestet. Hierbei wurde abweichend zu vorherigen Peptiden ein dodecameres Peptid wie beschrieben eingesetzt (Morinière et al., 2009, vollständige Sequenz, siehe 3.4).

Bindungsparameter der Interaktion von BD1 und BD2 mit doppelt-acetyliertem Peptid

Zur Charakterisierung der potentiellen Bindung des doppelt-acetylierten Peptids H4-K5(ac)K8(ac) an die Bromodomänen von Brd4 wurden ITC-Messungen mit dem Peptid und den beiden BDs durchgeführt. Wie zuvor wurde BD1 aus der Spritze in die Peptidlösung titriert, wobei im Fall von BD2 aufgrund von Löslichkeitsproblemen die Titrationsschemata umgedreht wurden (Abbildung 56). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch die Messwerte der Titration von BD1 und BD2 in das einfach acetylierte H4-K5(ac)-Oktapeptid (Abschnitt 4.2.3) aufgeführt.

Die Auswertung der ITC-Messungen zeigte auch für Brd4-Bromodomänen eine Präferenz des doppelt-acetylierten Peptids für BD1, da der ermittelte K_d -Wert mit 38 μM fast zehnfach niedriger war als bei der Bindung des einfach-acetylierten Peptids H4-K5(ac), welches einen K_d von 325 μM zeigte. Im Vergleich dazu band BD2 an das doppelt-acetylierte Peptid mit einem K_d von 212 μM im Bereich Ein Vergleich zum H4-K5(ac)-Peptid zeigte sogar eine leichte Verschlechterung der Bindung, welche zuvor bei 107 μM gelegen hatte.

Damit konnte auch für Brd4 eine klare Bevorzugung der ersten Bromodomäne BD1 gegenüber BD2 durch das doppelt-acetylierte Peptid H4-K5K8(ac) nachgewiesen werden.

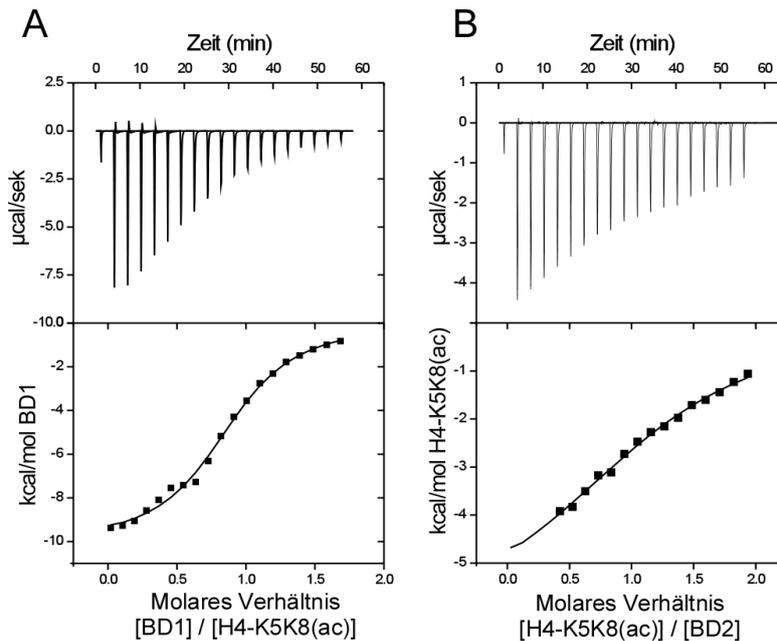


Abbildung 56: ITC-Messungen des doppelt-acetylierten Peptids mit BD1 und BD2 von Brd4. A) ITC-Spektrum der Titration von 3,45 mM BD1 zu 500 μM H4-K5(ac)K8(ac) bei 25°C B) ITC-Messung von 5 mM H4-K5(ac)K8(ac) gegen 500 μM BD2 in der Spritze. C) Ergebnisse der ITC-Titrations des doppelt-acetylierten Peptids und der Bromodomänen von Brd4. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der ITC-Messungen von H4-K5(ac) aus 4.2.3 erneut aufgeführt.

Titration	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	molares Verhältnis n
BD1 zu H4-K5(ac)	325	-1,99	2,35	-4,34	2,35
BD1 zu H4-K5K8(ac)	38	-10,04	-3,99	-6,05	0,90
BD2 zu H4-K5(ac)	107	-1,81	3,61	-5,42	1,91
H4-K5K8(ac) zu BD2	212	-6,35	-1,34	-5,01	1,21

Es zeigten sich deutliche Unterschiede beim Vergleich der thermodynamischen Parameter ΔH und $T\Delta S$: Während in bisherigen Messungen mit einfach-acetylierten Peptiden Änderungen der Enthalpie ΔH im Bereich von -0,5 bis -2,4 kcal/mol gemessen wurden, war ΔH für die Bindung des H4-K5K8(ac)-Peptids an BD1 auf -10 kcal/mol etwa 5-fach stärker ausgeprägt als bei den einfach-acetylierten Fragmenten. Bei der Bindung von BD2 an H4-K5(ac)K8(ac) wurde ein ΔH von -6,4 kcal/mol gemessen. Ebenso drastisch waren die Unterschiede zwischen $T\Delta S$, welche im Falle der monoacetylierten Peptide im positiven Bereich bei 1,5 bis 5 kcal/mol gelegen hatten. Bei der Bindung der Bromodomänen an das doppeltacetylierte Peptid ergaben sich dagegen Werte von -4 und -1,3 kcal/mol für $T\Delta S$, die den starken Effekt der Enthalpie teilweise aufhoben und so in eine moderate Affinität umwandeln. Die ermittelten Stöchiometrien der Bindungen ergaben sich zu 0,9 (BD1) und 1,2 (BD2) und indizierten eine 1:1-Bindung.

Kristallographische Untersuchung des Komplexes aus BD1 und H4-K5(ac)K8(ac)-Peptid

Die Charakterisierung der thermodynamischen Parameter sollte durch eine kristallographische Untersuchung des Komplexes aus BD1 und dem doppelt-acetylierten H4-K5(ac)K8(ac)-Peptid komplettiert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die enge Kristallpackung der Brd4 BD1-Kristalle einen Verlauf des Peptids wie in BrdT BD1 (Morinière

et al, 2009) verhindert. Der C-Terminus von Brd4 BD1 wird durch die Interaktion mit Resten der äußeren BC-Schleife des Nachbarmoleküls stabilisiert, wodurch eine Wechselwirkung des Peptids mit dieser Region von BD1, wie sie im Fall von BrdT BD1 auftritt, nicht möglich ist (Morinière et al, 2009). Trotzdem wurde versucht, den Komplex der Bromodomäne aus Brd4 und des doppelt-acetylierten Peptid zu formen und dessen Struktur zu ermitteln. In dieser Struktur konnte zwar die Elektronendichte eines Acetyllysins nahe N140 identifiziert werden, jedoch war die Elektronendichte des restlichen Peptids nur unzureichend aufgelöst (Abbildung 57 A, B) und eine Zuordnung der Acetyllysindichte zu K5(ac) oder K8(ac) nicht eindeutig möglich.

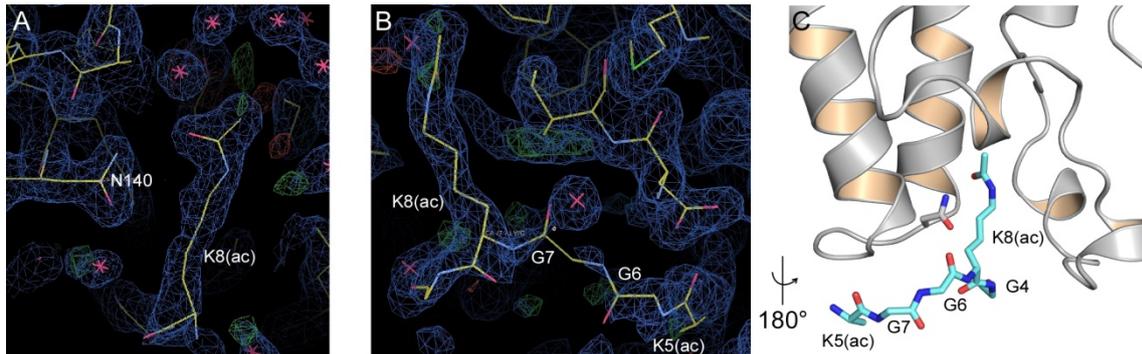


Abbildung 57: Bindung des diacetylierten H4-K5(ac)K8(ac)-Peptids an Brd4 BD1. A) Die $2F_oF_c$ -Elektronendichte in der Bindungstasche bei $1,0 \sigma$ konnte einem Acetyllysins zugeordnet werden. B) Die $2F_oF_c$ -Elektronendichte der benachbarten Aminosäuren des Peptids bei $1,0 \sigma$ waren weniger gut aufgelöst und konnten nicht zuverlässig eingebaut werden. C) Als Modell des H4-K5(ac)K8(ac)/BD1-Komplexes wurde K8(ac) in der Bindungstasche positioniert, während dem zweiten Acetyllysins K5(ac) keine sichtbare Interaktion mit BD1 einging und aufgrund fehlender Dichte nicht eindeutig zugeordnet werden konnte.

In dem in Abbildung 57 C dargestellten Strukturmodell wurde K8(ac) in die Bindungstasche positioniert, während das Peptidrückgrat des zweiten Acetyllysins K5(ac) außerhalb der Bindungstasche liegt. Die mangelnde Elektronendichte erlaubte jedoch keine Positionierung der Seitenketten dieses Restes, wodurch diese Zuordnung als nicht gesichert angesehen werden muss. Da jedoch N-terminal von K8(ac) kleine Aminosäuren liegen müssten und die Elektronendichte der Ausrichtung der Hauptkette des Acetyllysins und der benachbarten Reste diesen Anforderungen entsprachen, wurde K5(ac) mit seinen N-terminalen Resten Glycin und Arginin für diese Position ausgeschlossen und K8(ac) in die Bindungstasche positioniert.

Der Sequenzvergleich von BrdT BD1 mit dem in dieser Arbeit untersuchten Brd4 BD1 zeigte, dass jene Aminosäuren aus BrdT BD1, welche Interaktionen zu dem doppelt-acetylierten Peptid vermitteln, auch in Brd4 BD1 sequenzkonserviert sind (Abbildung 58 A, konservierte Reste wurden hervorgehoben). Daher sollte eine Bindung beider Acetyllysine an BD1, wie sie in BrdT auftreten, auch in Brd4 BD1 möglich sein. Hierfür spricht auch die vergleichbare Verbesserung der Affinität für BrdT BD1 und Brd4 BD1. Auch der Vergleich der Sequenzen und Strukturen von BrdT BD1 und Brd4 BD2 verdeutlicht die hohe Konservierung der Bromodomänen. Auch in BD2 sind die entscheidenden Reste konserviert und die vorgestellten Strukturen von Brd4 BD1 und BD2 zeigen lediglich einen *rmsd*-Wert von der Struktur von BrdT BD1 von $0,53 \text{ \AA}$ (BD1) und $0,60 \text{ \AA}$ (BD2).

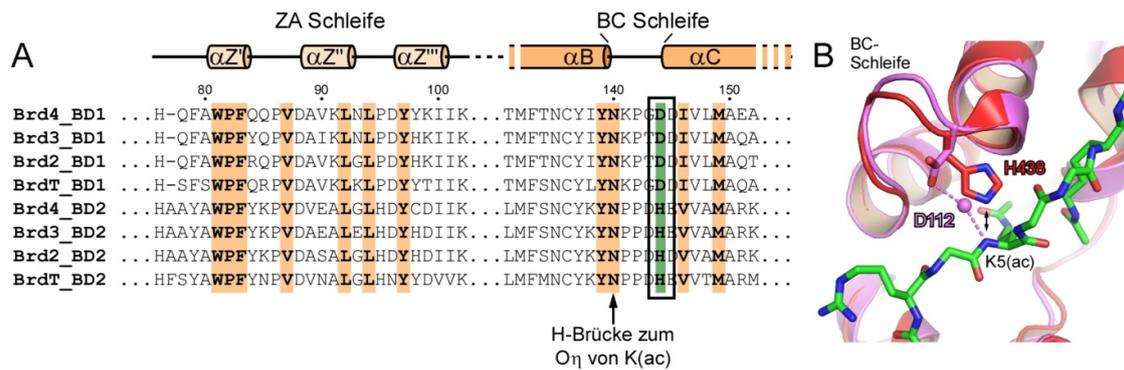


Abbildung 58: Vergleich von BrdT BD1 mit Brd4 BD2 und anderen BET-Familie-Bromodomänen. A) Ein Sequenzvergleich zeigt die hohe Konservierung der für die Bindung des doppelt-acetylierten Peptids essentiellen Aminosäuren (markiert in orange) zwischen Bromodomänen unterschiedlicher BET-Familie-Proteine. Einziger deutlicher Unterschied ist die Mutation eines Aspartats in BD1 zu Histidin in BD2 (grün markiert und umrandet). B) Die Überlagerung der Strukturen von BrdT BD1 und Brd4 BD2 zeigen die Positionierung des Hauptkettenstickstoffs des Acetyllysins (grün) durch D112 von BrdT BD1 (pink, 2WP2) über ein Wassermolekül, während in Brd4 BD2 (rot) H438 aus sterischen Gründen das Acetyllysins verdrängen würde.

In dem in Abbildung 58 A abgebildeten Sequenzvergleich fällt jedoch auf, dass in den BD2's von BET-Familie-Proteinen an Stelle eines Aspartats der BD1's (D144 in Brd4 BD1) ein Histidin auftritt (grüne Markierung). In der Überlagerung der Strukturen von BrdT BD1 mit gebundenem doppelt-acetylierten Peptid und Brd4 BD2 (Abbildung 58 B) wird deutlich, dass dieses Aspartat (D112 in BrdT BD1, pink) für die Spezifität des doppelt-acetylierten Peptids zu BD1 verantwortlich ist, da es eine indirekte Wasserstoffbrücke über ein Wassermolekül zum Hauptkettenstickstoff von Acetyllysins vermittelt. In BD2 befindet sich jedoch an dieser Position ein Histidin, welches durch seine Position zu nah an das Hauptkettenstickstoff des Acetyllysins positioniert und abstoßend wirken würde. Somit müsste die Bindung des Acetyllysins zu einer BET BD2 sich in der Positionierung und/oder dem Verlauf der Peptidkette von der Bindung an BD1-Bromodomänen unterscheiden.

Die dargestellten Ergebnisse bezüglich der Interaktion von Brd4 Bromodomänen mit Histon- und Nicht-Histonpeptiden verdeutlichen, dass die Interaktion von BDs mit Acetyllysinspeptiden schwach sind ($K_d = 100-300\mu\text{M}$). Die Interaktion hängt sowohl von Wasserstoffbrücken des Acetyllysins mit einer Reihe von konservierten Wassermolekülen der BDs, als auch von hydrophoben Wechselwirkungen der Bindungstasche der Acetylverzweigung ab. Verlängerungen dieser hydrophoben Verzweigung können zu einem gewissen Grad toleriert werden (Propionyl- bzw. Butyryllysins), bei drei zusätzlichen Methylengruppen (Valeroyllysins) unterbindet sie jedoch die Interaktion. Mit den Bindungsdaten und Komplexstrukturen von Propionyl- bzw. Butyryl-Peptiden wurde hier erstmals die Bindung von Nicht-Acetyllysinsresten in Bromodomänen beschrieben. Die Präferenz eines zweifachen Acetyllysinsmotivs an BD1 ($K_d: 38\mu\text{M}$) im Gegensatz zu BD2 ($K_d: 212\mu\text{M}$) konnte in Analogie zu BrdT auch für Brd4 gezeigt werden. Die Interaktion von Brd4 BDs mit acetylierten T1-Peptiden stellt zudem die erste Bindung von Brd4 BDs an Nicht-Histonpeptide dar und eröffnet neue Einblicke in die Regulation von P-TEFb.

4.3 Biochemische Charakterisierung des Ribonukleoproteins Larp7

Innerhalb des inhibierten P-TEFb-Komplexes spielt die 7SK snRNA eine zentrale Rolle als strukturgebendes Gerüst, welches mit den einzelnen Bestandteilen interagiert und sie stabilisiert (Egloff et al., 2006). Die 7SK snRNA wird ihrerseits durch das La-verwandte Protein Larp7 am 3'-Ende gebunden und durch diese Interaktion vor dem Abbau durch Exonukleasen geschützt (Krueger et al., 2008; He et al., 2008; Markert et al., 2008). Eine biochemische Charakterisierung des Proteins und seiner Domänen erfolgte jedoch bislang nicht. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Konstrukte des Larp7-Proteins biochemisch charakterisiert. Die Konstrukte sollten auf ihre 7SK-Bindungseigenschaften hin untersucht werden, um Aufschlüsse über die Beteiligung der Domänen an der RNA-Bindung zu gewinnen und ein detaillierteres Bild der Rolle der 7SK snRNA und ihres stabilisierenden Proteins Larp7 für die Inhibition von P-TEFb zu erhalten.

4.3.1 Darstellung der verschiedenen Larp7-Konstrukte

Die Untersuchung des 7SK-interagierenden Proteins Larp7 erforderte zunächst die Darstellung von Konstrukten, welche die drei charakteristischen Domänen La, RRM1 und RRM3 zusammen oder in isolierter Form enthielten (siehe Abbildung 59 A). Hierfür konnten vier stabile Larp7-Fragmente gewonnen werden (Abbildung 59 A), von denen zwei nur geringe N- und C-terminale Verkürzungen aufwiesen und die La-, RRM1- und RRM3-Domäne umfassten (L7-1 (24-573) und L7-2 (24-555)). Zwei weitere Konstrukte enthielten die N-terminale La- und RRM1-Domäne (32-202; L7-3) oder die C-terminale RRM3 (448-555; L7-4; Abbildung 59 A).

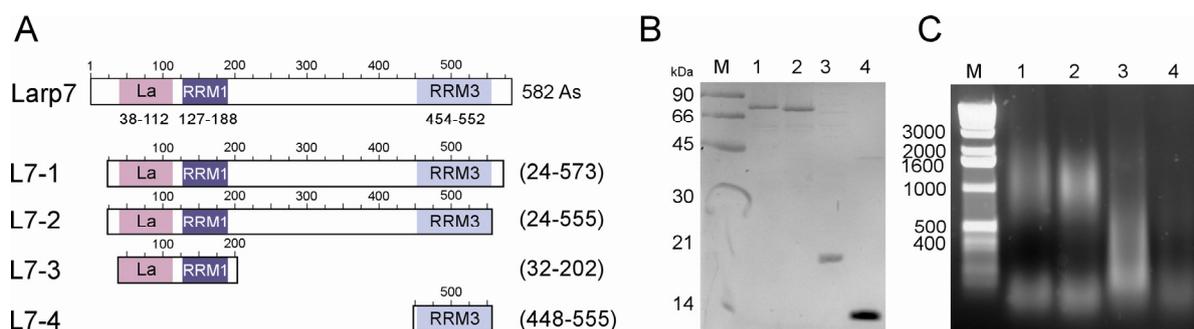


Abbildung 59: Erstellte Larp7-Konstrukte. A) Die schematische Darstellung von Larp7 zeigt die drei Domänen La (lila) und RRM1 (dunkelblau) im N-terminalen Bereich des Proteins, sowie der RRM3 (hellblau) am C-Terminus. Vier Konstrukte L7-1 bis L7-4 konnten stabil gereinigt werden. B) Per SDS-PAGE wurde bei Auftrag von 4 µg des Konstrukts die Reinheit der Proteine auf >95% bestimmt. C) In einem 1% Agarosegel wurden nach EtBr-Färbung jedoch starke Verunreinigungen der Proteine durch Nukleinsäuren sichtbar.

Die vier Konstrukte wiesen in einer SDS-PAGE nur geringfügige Verunreinigungen auf (Abbildung 59 B). In einem Agarosegel zeigte sich jedoch, dass die Proben starke

Nukleinsäureverunreinigungen aufwiesen, die durch die Ethidiumbromidfärbung sichtbar wurden (Abbildung 59 C). Sie schienen sowohl aus einzelnen Nukleinsäurefragmenten niedrigen Molekulargewichts (Abbildung 59 C, Spuren 1, 2 und 4), als auch aus größeren Nukleinsäuren von etwa 1000 bp zu bestehen (Spuren 1 und 2).

Optimierung der Larp7-Reinigungsstrategie

Da die im Agarosegel beobachteten Nukleinsäureverunreinigungen die Untersuchung der Bindung von Larp7 und der 7SK snRNA beeinflussen könnten, mussten eine Reinigungsstrategie entwickelt werden, welche einen hohen Reinheitsgrad des Produktes auch hinsichtlich auftretender Nukleinsäureverunreinigungen ermöglichte. Dabei sollte auf den Einsatz von DNasen oder RNasen verzichtet werden, um spätere RNA-Bindungsversuche durch entsprechende Kontaminationen nicht zu beeinträchtigen. Daher wurden die Reinigungen des L7-2-Konstrukts (24-555) und des N-terminalen L7-3 (32-202) um den Einsatz von Kationenaustauschchromatographie ergänzt. Diese Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Constanze Erdmann. Larp7 enthält einen überdurchschnittlich hohen Anteil positiv-geladener Aminosäuren und interagiert daher stark mit der negativ-geladenen Matrix des Kationenaustauschers. Aufgrund ihrer ebenfalls negativen Ladung wurden unspezifisch an Larp7 gebundene Nukleinsäuren nur schwach gebunden und konnten von den Larp7-enthaltenden Fraktionen getrennt werden.

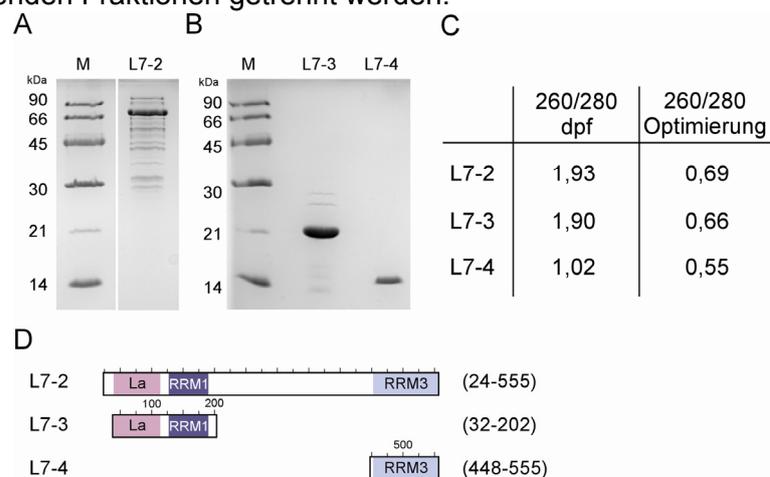


Abbildung 60: Larp7-Konstrukt nach Optimierung der Reinigung zur Abtrennung von Nukleinsäuren. A) Die SDS-PAGE von 3 µg gereinigtem L7-2-Protein (24-555) zeigten noch einige durch die Reinigung nicht entfernte Proteinkontaminationen, so dass sich eine Reinheit des Proteins von etwa 80% ergab. B) 3 µg der Proteine L7-3 (32-202) und L7-4 (448-555) zeigten dagegen eine hohe Reinheit von 90-95%. C) Der Vergleich der Absorptionen bei 260 nm/280 nm wies bei den ursprünglich erstellten Proteinen Verhältnisse von 1,02 bis 1,93 auf, nach der optimierten Reinigung waren diese auf 0,55-0,69 gesunken und zeigten damit die Reduktion der Nukleinsäureverunreinigungen von ursprünglich 40% auf nun 2%. D) Domänenübersicht der Proteine, deren Reinigung optimiert wurde.

Die erhaltenen Konstrukte wiesen eine anhand des SDS-PAGE-Gels abgeschätzte Reinheit von 80%-95% auf (Abbildung 60 A und B). Durch Ethidiumbromidfärbung dieser Proteinfractionen in einem Agarosegel konnten keine Nukleinsäuren mehr nachgewiesen werden. Es wurde zusätzlich der Quotient der Absorptionen der Probe bei 260 nm und 280 nm bestimmt, welcher Aufschluss über Protein- und Nukleinsäureanteile der Probe liefert. Die Bestimmung des Verhältnisses OD_{260nm}/OD_{280nm} zeigte für die ursprünglichen Konstrukte ein Verhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} von etwa 1,9 (siehe Abbildung 59 A). Dies entspricht

einem Anteil von etwa 40% Nukleinsäuren (Cold Spring Harb. Protoc., 2006). Das RRM3-Konstrukt L7-4 enthielt neben dem Protein etwa 5% DNA oder RNA, verdeutlicht durch einen Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} von 1,0. Nach der Optimierung der Reinigungen konnte das Verhältnis auf 0,69 und 0,66 für die Konstrukte L7-2 und L7-3 reduziert werden (Abbildung 60 C), entsprechend einem Anteil von etwa 2% Nukleinsäuren in der Probe. L7-4 wies mit 0,55 keine Verunreinigungen durch Nukleinsäuren mehr auf. Somit wurden durch die Optimierung der Reinigungen Larp7-Konstrukte erstellt, welche durch Entfernung unspezifisch gebundener Nukleinsäuren nun zur Charakterisierung der Domänen und ihrer Interaktion mit der 7SK snRNA und anderen putativen Bindungspartnern eingesetzt werden konnten.

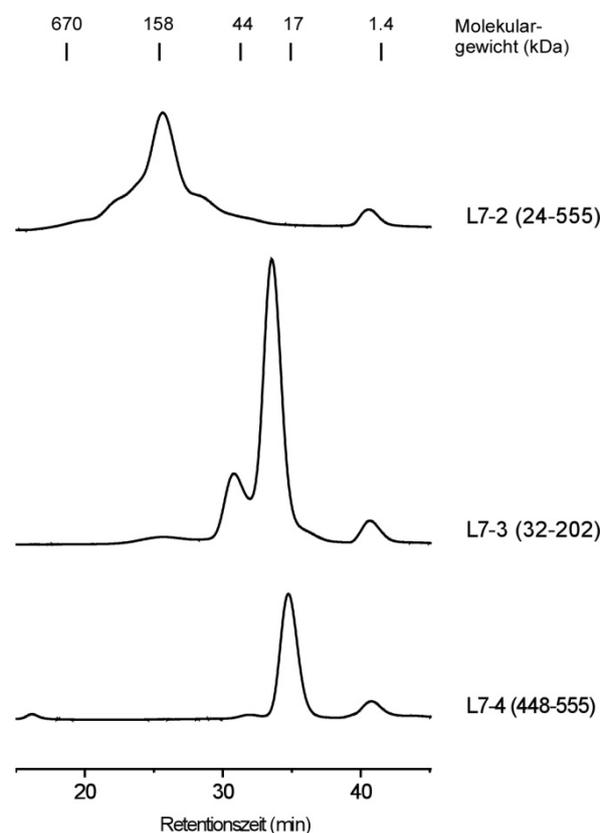
4.3.2 Biochemische Charakterisierung der Larp7-Konstrukte

Nachdem die Konstrukte von Larp7 mit den drei identifizierten Domänen (L7-2, 24-555), mit den N-terminalen Domänen La und RRM1 (L7-3, 32-202) und der C-terminalen RRM3-Domäne (L7-4, 448-555) nukleinsäurefrei gereinigt werden konnten, wurden diese nun per analytischer Gelfiltration auf ihre Homogenität und ihren Oligomerisierungszustand untersucht. Per CD-Spektroskopie wurde zudem ihr Sekundärstrukturgehalt quantifiziert.

Analytische Größenausschlusschromatographie der Larp7-Konstrukte

Mittels analytischer Gelfiltrationssäule wurden die apparenten Molekulargewichte der gereinigten Konstrukte in Zusammenarbeit mit Frau Constanze Erdmann ermittelt. Das längste Konstrukt L7-2 (24-555) eluierte bei einer Retentionszeit von 26 min, entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa (Abbildung 61 A). Damit wich das apparente Molekulargewicht der Probe von L7-2 deutlich vom errechneten Molekulargewicht von 61 kDa ab. Dies machte eine Bestimmung des Oligomerisierungszustandes des Proteins schwierig, da die apparente Masse mit 150 kDa dem 2,5-fachem der berechneten Masse entsprach.

Abbildung 61: Analytische Gelfiltration der Larp7-Konstrukte. A) Das Retentionsprofil von 100 µg L7-2 (24-555) in 50 mM HEPES, pH 7,0, 350 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM β-ME wies eine Elutionszeit von 26 min auf. B) L7-3 (32-202) zeigte ein deutliches Absorptionsmaximum bei 34 min, sowie einen zweiten Peak bei 31 min. C) 100 µg aufgetragenes L7-4 (448-555) eluierte mit einem einzelnen Ausschlag der Absorption bei 35 min.



Die Absorption des Proteins zeigte zudem Absorptionen vor und nach dem Hauptpeak, die auf eine geringe Inhomogenität des Proteins hindeuteten.

L7-3 (32-202), welches die beiden N-terminalen RNA-Bindungsdomänen La und RRM1 enthielt, wies ein Absorptionsmaximum bei einer apparenter Masse von 25 kDa auf (Abbildung 61 B). Die tatsächliche Masse des Proteins wurde auf 19,7 kDa berechnet, so dass L7-3 in monomerer Form vorzuliegen schien. Auch in dieser Probe konnte eine geringe Inhomogenität der Proteinprobe beobachtet werden.

Das C-terminale L7-4-Konstrukt der RRM3 (448-555) zeigte im Unterschied zu den anderen beiden Proteinen ein Maximum der Absorption bei einem apparenten Molekulargewicht von 20 kDa, während die berechnete Masse des RRM3-Konstrukts bei 12 kDa lag. Damit ist auch hier keine eindeutige Aussage über den Oligomerisierungsgrad des Proteins möglich. Bei allen drei Proteinen konnte zudem ein Ausschlag der Absorption bei einer späten Retentionszeit von 41 min beobachtet werden, dessen Elutionszeit mit der einer ATP-Lösung übereinstimmte. Daher könnte der späte Ausschlag der Absorption in den Retentionsspektren der drei Lar7-Proteine auf einzelne Nukleotide oder kurze Nukleinsäurefragmente zurückgeführt werden, welche trotz der optimierten Reinigung nicht entfernt werden konnten.

Abschätzung der Sekundärstrukturanteile per CD-Spektroskopie

Zur Abschätzung der Faltung der gereinigten Proteine wurden CD-Spektren von 190-260 nm in Zusammenarbeit mit Frau Constanze Erdmann aufgenommen und hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturelemente unter Verwendung des Servers Dichroweb (Whitmore und Wallace, 2008) ausgewertet (Abbildung 62).

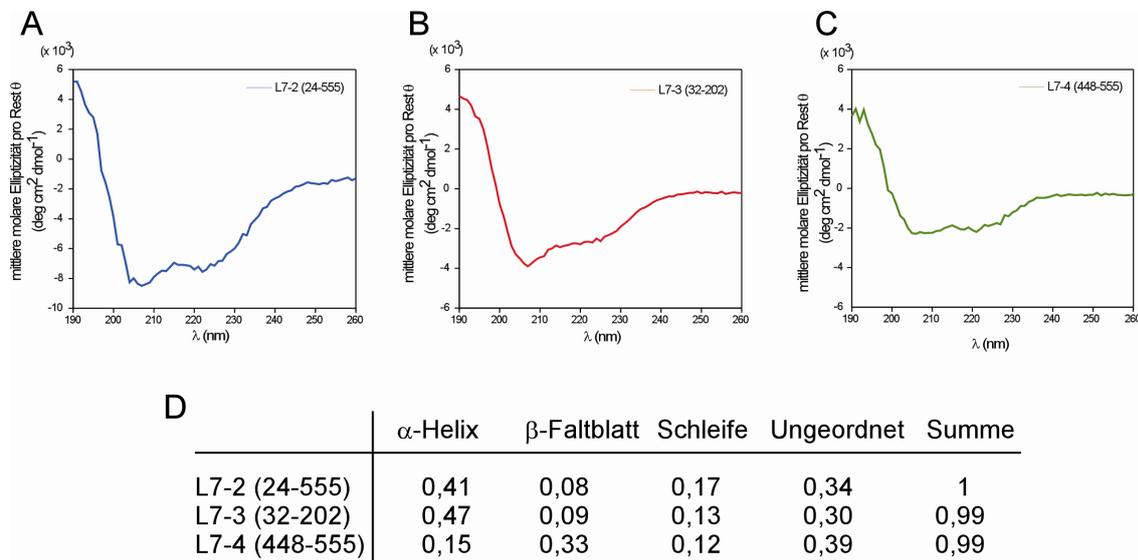


Abbildung 62: Sekundärstrukturbestimmung der Lar7-Konstrukte per CD-Spektroskopie. A-C) CD-Spektren der drei Lar7-Konstrukte L7-2 (24-555), L7-3 (32-202) und L7-4 (448-555) in 5 μ M KP_I -Puffer, pH 7,5, aufgetragen in mittlerer, molare Elliptizität pro Rest in Abhängigkeit von der Wellenlänge. D) Sekundärstrukturanteile der drei Konstrukte, berechnet durch das Programm Dichroweb (Whitmore und Wallace, 2008). In den Konstrukten L7-2 und L7-3 dominierten α -helikale Strukturen, während im RRM3-Konstrukt L7-4 eher β -Faltblätter und ungeordnete Regionen auftraten.

Das längste Konstrukt L7-2 (24-555) zeigte das ausgeprägteste CD-Spektrum mit einer mittleren, molaren Elliptizität pro Rest von bis zu $-8000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ (Abbildung 62 A). Die Sekundärstruktur dieser Probe wurde zu 41% α -helikalen Anteilen berechnet, während β -Faltblätter und Schleifen nur 25% des Proteins ausmachten. Etwa ein Drittel des Proteins lag in ungeordneter Form vor. Auch das N-terminale Konstrukt L7-3 (32-202) zeigte eine hauptsächliche Organisation in α -Helices (47%), es lagen ebenfalls ein Drittel der Reste ungeordnet vor. (Abbildung 62 B und D).

4.3.3 Bindung von Larp7 und der 7SK RNA

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die Proteine gefaltet und größtenteils homogen vorlagen, wurde im Folgenden nun untersucht, ob die drei Proteine mit der 7SK snRNA interagieren können.

Interaktion der Larp7-Konstrukte mit der 7SK snRNA

In einem elektrophoretischen Gelverschiebungstest (EMSA) wurde $1 \mu\text{M}$ 7SK snRNA mit ansteigenden Mengen ($0,5\text{-}2 \mu\text{M}$) der Larp7-Proteine vermengt und durch ein EMSA auf ihr Laufverhalten im Gel hin untersucht. Im Gel des EMSAs von Vollängen-7SK mit L7-2 (24-555) zeigte sich bei der Inkubation der RNA mit dem Protein, welches alle drei DNA-Bindungsdomänen beinhaltet, eine deutliche Verschiebung der Laufweite der RNA-Bande (Abbildung 63 A, Spur 2) im Vergleich zur unbeeinflussten RNA-Bande (Spur 1). Dabei konnte in diesem Ansatz mit $1 \mu\text{M}$ RNA und $0,5 \mu\text{M}$ Protein sowohl die Bande der freien RNA als auch eine weitere Bande reduzierter Migrationsweite gefunden werden, welche vermutlich dem RNA-Proteinkomplex entspricht. Bei Zugabe von größeren Mengen Proteine in den Spuren 3-5 verschob sich diese potentielle RNA-Proteinbande zu weiter verkürzten Laufweiten. Die Lauffront wurde jedoch bei dieser Verschiebung unschärfer. In den Spuren 4 und 5 wurde zudem ein Teil des RNA-Proteingemisches in der Beladungstasche des Gels gefunden. Dies deutet auf eine starke Aggregation des RNA-Proteingemisches bei Zugabe von mehr Larp7 hin, welches das Eintreten in das Gel verhindert. Bei Betrachtung der Bande der freien RNA in Spur 1 zeigten sich außerdem Verunreinigungen der RNA, die möglicherweise Abbauprodukte der RNA darstellen.

Um die beobachteten Bindungsbanden mit denen einer spezifischen Interaktion vergleichen zu können, wurde in Abbildung 63 D parallel die Interaktion von 7SK snRNA mit dem spezifischen Bindungspartner Hexim1 (Hxm1) überprüft. Dabei konnte die Bildung von distinkten Banden bei Zugabe von einem Überschuss an Hxm1 zu der 7SK beobachtet werden (Abbildung 63 D, Spuren 2-4). Sie diente auch in den folgenden EMSAs als Positivkontrolle. Jedoch konnte bei Inkubation von 7SK mit der doppelten Menge von Hxm1 ebenfalls die Aggregation des Komplexes beobachtet werden (Abbildung 63 D, Spur 5). Dies macht beim Vergleich mit der Interaktion von Larp7 mit 7SK deutlich, dass im Falle von Larp7 neben der spezifischen Interaktion in distinkten Banden (Abbildung 63 A, Spur 2) auch unspezifische Interaktionen auftreten, die zu unscharfen Banden führen (Abbildung 63 A,

Spuren 3-5). Die Interaktion von 7SK mit GST als Kontrolle führt zu keiner spezifischen oder unspezifischen Interaktion und dadurch zu keiner Verschiebung der RNA (Abbildung 63 E).

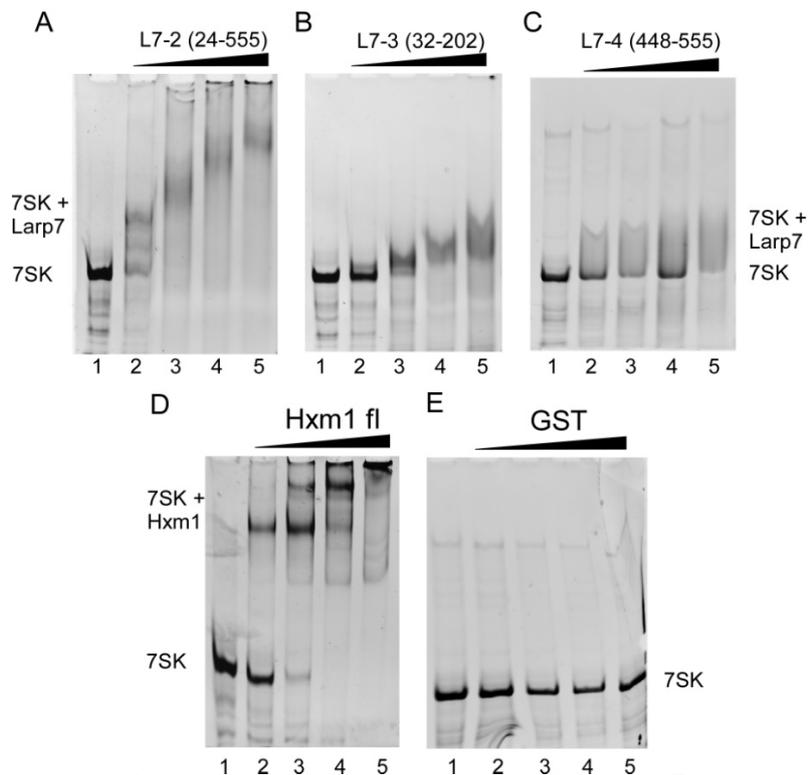


Abbildung 63: EMSAs der Interaktion der 7SK snRNA mit Larp7. A) 1 μ M 7SK snRNA formten mit 0,5-2 μ M L7-2 zunächst eine distinkte Bande mit verzögertem Migrationsverhalten (Spur 2). Bei höheren Larp7-Konzentrationen (Spuren 3-5) verringerte sich die Laufweite der Banden weiter, jedoch wurden die Banden zunehmend unscharf und es zeigten sich Aggregate, die nicht ins Gel eintraten. Alle gezeigten Gele wurden mit EtBr gefärbt. B) Im EMSA von L7-3 mit 7SK konnte ebenfalls distinkte Banden gefunden werden (Spur 2), die mit ansteigenden Konzentrationen in ihrer Laufweite verzögert und zunehmend unscharf wurden. C) Nach der Inkubation von 0,5-2 μ M L7-4 mit 7SK konnten nur unscharfe Schleier im EMSA identifiziert werden.

D) In der Positivkontrolle des EMSAs von 7SK und Hxm1fl zeigten scharf abgegrenzte Banden die spezifische Interaktion von RNA und Protein. E) In der Negativkontrolle (7SK und GST) konnte keine Interaktion beobachtet werden.

Auch die verkürzten Konstrukte L7-3 (32-202) und L7-4 (448-555) wurden auf eine Interaktion mit 7SK hin untersucht. L7-3, welches die N-terminalen La- und RRM1-Domänen enthält und der RNA-bindenden Region in La entspricht, interagiert mit der 7SK snRNA. Dabei bildeten sich in den Spuren 2 und 3 (Abbildung 63 B) zunächst distinkte Banden, jedoch wurden die Banden mit steigenden Proteinkonzentrationen zunehmend unscharf, so dass auch hier vermutlich spezifische und unspezifische Interaktionen des Proteins mit der 7SK snRNA vorliegen. Das Konstrukt des RRM3s L7-4 zeigte dagegen keine distinkte Bandenbildung, sondern auch bei geringen Konzentrationen die Bildung von schlierenartigen Bereichen im Gel. Dies deutet nicht auf eine spezifische Interaktion von L7-4 und der Volllängen-7SK snRNA hin (Abbildung 63 C).

Durch die beschriebenen EMSAs konnte somit gezeigt werden, dass die Larp7-Konstrukte, die die N-terminalen La- und RRM1-Domänen enthalten, deutlich mit der 7SK snRNA interagieren. Die C-terminale RRM3-Domäne interagiert dagegen nur leicht mit der RNA, und die schlierenartige Unschärfe der Banden lässt auf unspezifische Interaktionen zwischen dem Protein und der RNA schließen. Auch bei den anderen Konstrukten L7-2 (24-555) und L7-3 (32-202) treten solche unscharfen Banden auf, die darauf hindeuten, dass durch den überdurchschnittlich hohen Anteil an positiv-geladenen Aminosäuren in Larp7 (22% Lysine und Arginine) unspezifische Interaktionen mit den negativen Phosphatgruppen der RNA auftreten. Möglicherweise könnte ebenso aufgrund einer niedrigen Affinität von

Larp7 und 7SK eine vollständige Verschiebung unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentrationen nicht möglich gewesen sein.

Verschärfung der Interaktionsbanden durch Zugabe von Heparin

Die Unschärfe der Banden (Abbildung 63 A), vermutlich ausgelöst durch zu geringe oder unspezifische Interaktionen von L7-2 (24-555) mit der 7SK snRNA, macht eine Quantifizierung der Interaktion zwischen RNA und Protein schwierig. Unspezifische Interaktionen können durch Zugabe von beispielsweise kurzen Poly-d(A-T)-Nukleinsäuren kompetitiv unterbunden werden (Hellman und Fried, 2007). Jedoch erfordert dies die radioaktive Markierung der RNA mit anschließender Detektion des radioaktiven Signals, da die Poly-d(A-T)-Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid ebenfalls angefärbt würden. Um eine radioaktive Markierung der 7SK snRNA zu vermeiden, wurde versucht, durch Variation der Pufferbestandteile unspezifische Interaktionen von Larp7 und der 7SK snRNA zu unterbinden. Während die Varianz der Pufferbestandteile keine Verbesserung der Komplexdarstellung brachten, wurde eine deutliche Verbesserung durch Zugabe ansteigender Mengen von Heparin zu dem Reaktionsansatz erreicht, wie es in Ryder, Recht und Williamson vorgeschlagen wurde (Ryder, Recht und Williamson, 2008). Die unscharfen Banden des EMSAs von L7-2 mit 7SK (Abbildung 64 A) wurde durch Zugabe von 5 μg Heparin unterbunden. Die Interaktion von Larp7 und der RNA konnte nun als deutliche Verschiebung der RNA-Bande (Abbildung 64 B, Spur 1) zu einer klar abgegrenzten Bande des Protein-RNA-Komplexes beobachtet werden (Spur 2). Die Laufhöhe des Komplexes änderte sich auch bei Zugabe von höheren Konzentrationen des Proteins nicht mehr (Abbildung 64 B, Spur 3-5). Die Bande der freien RNA war bei Inkubation mit 1 μM – 1,5 μM (Spuren 3-4) vollständig in die Komplexbande übergegangen. Unter Berücksichtigung der Verunreinigungen in L7-2 (siehe 4.1.1, Abbildung 60 A) und der 7SK RNA, die bei der Bestimmung der Konzentrationen nicht berücksichtigt wurden und die die tatsächlichen Mengen L7-2 und 7SK im EMSA-Ansatz verringern, ist für die Bindung von L7-2 mit der Volllänge 7SK snRNA von einer 1:1-Bindung auszugehen.

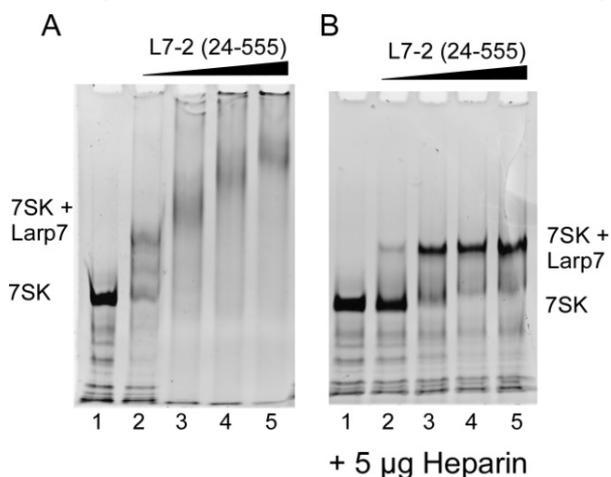


Abbildung 64: EMSA-Gele von L7-2 und 7SK vor und nach Heparinzugabe. A) Gel der Interaktion von L7-2 und 7SK wie in Abbildung 63 A dargestellt. B) Die Interaktionsbanden von L7-2 und 7SK konnte durch Zugabe von 5 μg Heparin in den EMSA-Ansatz zu klar definierten Banden geändert werden. Dabei wurden die vollständige Bindung von Protein und RNA bei einem Protein:RNA-Verhältnis von 1:1 bis 1:1,5 festgestellt.

Die Zugabe von Heparin zur Verhinderung unspezifischer Interaktionen zwischen Larp7 und 7SK wurde auch in anderen Methoden zur Untersuchung der Interaktion angewandt. Die Komplexbildung von L7-2 und 7SK konnte von Frau Janna Bigalke durch analytische Größenausschlusschromatographie gezeigt werden. Bei der Inkubation der Ansätze mit

Heparin vor der Injektion auf die analytische Gelfiltrationssäule wurde eine deutliche Verschärfung des Elutionspeaks von Larp7 und der RNA beobachtet. Die Interaktion von Larp7 und 7SK wurde dabei sowohl in isolierter Form als auch im Kontext des inhibierten P-TEFb Komplex aus P-TEFb (Cdk9 und CycT1), Hxm1, Larp7 und der 7SK snRNA beobachtet. Somit stellt Heparin ein wirksames Mittel zur Darstellung von Larp7 in elektrophoretischen und chromatographischen Methoden dar.

Spezifität der Bindung von Larp7 an 3'-UUU_{OH}-7SK

In den bisherigen Publikationen wurden die Spezifität der Bindung von Larp7 an das 3'-UUU_{OH}-Ende der 7SK snRNA durch Vergleich der Bindung des Wildtyp-Konstrukts und die 3'-deletierte Variante der 7SK untersucht. Dabei wurde durch die Deletion dieses PolyU-Motives von 7SK die Bindung an Larp7 unterbunden (He et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die Mutation des PolyU-Motivs von UUU zu UAG auf die Bindung an Larp7 auswirkt.

Die Bindung von L7-2 (24-555) an die synthetisierte Vollängen-7SK mit 3' UAG_{OH} wurde in einem EMSA in Gegenwart von 5 µg Heparin überprüft und mit der Bindung von Larp7 an die Wildtyp 3' UUU_{OH}-7SK verglichen (Abbildung 65).

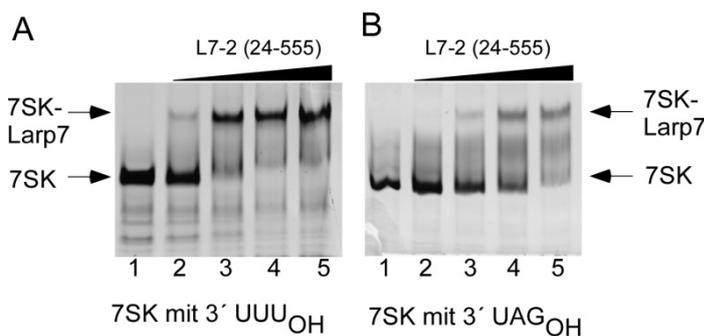


Abbildung 65: Spezifität vom Larp7 zu den 3' UUU_{OH}-Nukleotiden der 7SK snRNA. A) EMSA von L7-2 und 7SK wie in Abbildung 64 B dargestellt. B) Der EMSA der Interaktion von 1 µM 3' UAG_{OH} 7SK mit 0,5-2 µM L7-2 zeigte die teilweise Verschiebung der Bande der freien RNA (Spur 1) zu einer Bande geringerer Laufweite, jedoch war diese Verschiebung auch bei Inkubation mit 2 µM L7-2 nicht vollständig (Spur 5).

In dem EMSA-Experiment zeigte sich, dass auch die 3' UAG_{OH}-RNA trotz der Mutation des PolyU-Motivs durch L7-2 (24-555) im EMSA zu einer geringeren Migrationsweite verschoben werden kann. Allerdings trat diese Verschiebung erst bei höheren Konzentrationen auf, ohne eine vollständige Verschiebung der freien RNA-Bande zu erreichen (Abbildung 65 B). Bei Verwendung der Wildtyp- 3' UUU_{OH} 7SK war eine vollständige Bindung schon bei 1,5 µM L7-2 aufgetreten (Abbildung 65 A). Somit wurde durch die Mutation der 3'-Reste von 7SK zu UAG_{OH} die Interaktion zu Larp7 deutlich geschwächt, die Bindung wurde jedoch nicht vollständig unterbunden. Dies deutet einerseits auf eine Schwächung der Affinität von Larp7 und der 7SK snRNA durch die Mutation der zwei 3'-Nukleotide zu AG_{OH} hin. Andererseits scheint dies die Bedeutung der RRM3 für die Interaktion mit 7SK zu unterstreichen, da trotz der Mutation der Bindungsstelle von La- und RRM1-Domäne weiterhin Bindung von Larp7 und 7SK snRNA zu beobachten ist.

Interaktion von Larp7 mit einem minimalen 7SK-Konstrukt des 3'-Endes

Nachdem die Interaktion von Larp7 mit der 7SK snRNA gezeigt werden konnte, wurde nun überprüft, ob für diese Bindung das 3'-Ende der 7SK RNA, welches die für die Bindung essentiellen PolyU-Nukleotide am 3'-Ende trägt, ausreichen würde, oder ob andere Bereiche

für die Bindung an Larp7 benötigt werden. Ein 39 nt Fragment der 7SK snRNA von Nukleotidposition 294-332, welches die 3'-Nukleotide der 7SK einschließlich des terminalen UUU_{OH}-Endes, enthielt, wurde zunächst in einem EMSA auf eine Interaktion mit den Larp7-Konstrukten L7-2 und L7-3 untersucht. Da bereits im EMSA der Vollängen-7SK RNA keine spezifische Interaktion mit dem C-terminalen RRM3-Konstrukt L7-4 beobachtet werden konnte, wurde dieses hier vernachlässigt.

Im EMSA von L7-2 (24-555) mit 2 μ M der 39 nt 7SK zeigte sich eine deutliche Interaktion von L7-2 schon bei einem Unterschuss von 1 μ M L7-2 (Abbildung 66 A, Spur 2). Zugabe von mehr Protein führte zur weiteren Verschiebung der Komplexbande (Spur 3), und bei einer Konzentration von L7-2 von 3 μ M und höher lief der aggregierte Komplex nicht mehr ins Gel ein (Spur 4 und 5). Bei der Inkubation der 3' 39 nt 7SK RNA mit L7-3 (32-202) zeigte sich ebenfalls eine Interaktion zwischen Protein und RNA, jedoch war diese deutlich schwächer als bei L7-2: Eine Verschiebung der Bande der freien RNA (Abbildung 66 B, Spur 1) zu einer höher auftretenden Bande des Komplexes wurde erst bei Zugabe von 2 μ M L7-3 sichtbar (Spur 2, das entspricht 1:1 Protein zu RNA), und auch bei der doppelten Menge L7-3 konnte keine vollständige Bindung beobachtet werden (Spur 5).

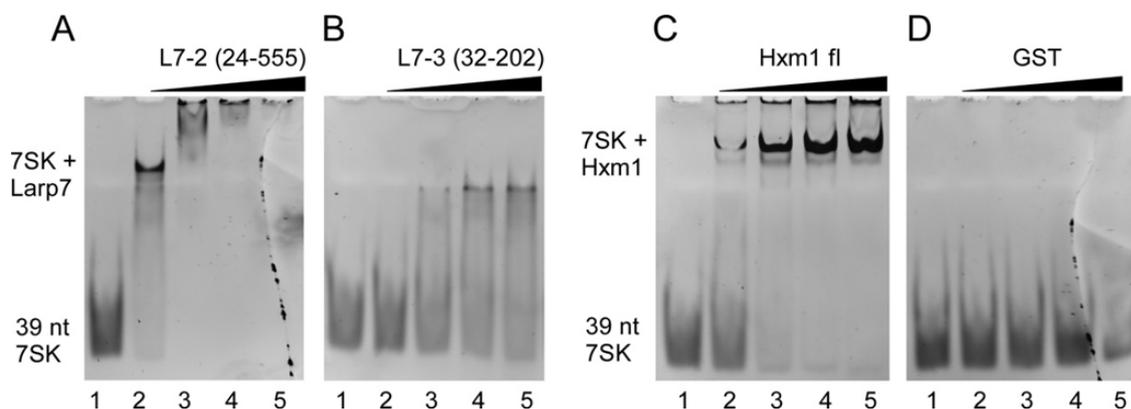


Abbildung 66: Interaktion der 3' 39 nt 7SK RNA mit Larp7-Konstrukten. A) Die Bindung von L7-2 39 nt 7SK im EMSA-Gel zeigte die vollständige Verschiebung der RNA-Bande von der freien zur komplexierten Form bei einer 1:1-Mischung von Protein und RNA. Danach konnte nur noch Komplex in der Geltasche angefärbt werden. B) Bei Inkubation mit L7-3 wurde die 39 nt 7SK RNA dagegen in eine distinkte Bande verschoben, die jedoch auch bei einem Überschuss an L7-3 nicht zur vollständigen Verschiebung führte. C) Als Positivkontrolle wurde die Bindung der RNA mit Hxm1 im EMSA aufgelöst, die in einer klaren Komplexbande resultierte. D) Die Negativkontrolle mit GST zeigte keine Interaktion mit 7SK.

Allerdings zeigte sich hier keine Verschiebung der Bandenhöhe durch Zugabe von höheren Konzentrationen von L7-3, sondern die Laufhöhe der in Spur 3 erstmals auftretenden Bande blieb auch in Spur 4 und 5 konstant. Als Kontrolle wurden parallel auch die Interaktion des 39 nt-Fragments von 7SK mit Hxm1 überprüft, dabei zeigte das DNA/RNA-bindende Hxm1 die Verschiebung der freien RNA-Bande (Abbildung 66 C, Spur 1) zu einer höheren Bande, deren Höhe sich nun mit ansteigenden Konzentrationen von Hxm1 nicht mehr veränderte (Spur 2-5). GST interagiert dagegen nicht mit der 39 nt 7SK (Abbildung 66 D).

Bei der Überprüfung, ob auch im Falle der kürzeren 39 nt 7SK unspezifische Interaktionen zwischen RNA und dem stark positiv-geladenen Larp7-Protein durch Heparin verhindert werden könnten, zeigte sich, dass bei Zugabe von Heparin zu dem EMSA einerseits die Laufform der RNA beeinträchtigt wurde (Abbildung 67 B, Spur 1), andererseits

konnte nun keine vollständige Bindung der RNA mehr beobachtet werden. Auch die Höhe der Komplexbande wurde durch das Heparin verringert (Spur 2-5). Somit wurden durch die Zugabe von 5 µg Heparin zwar die Banden verschärft, jedoch wurde die Interaktion von Protein und RNA auch deutlich beeinträchtigt, was für die Vollängen-7SK RNA nicht beobachtet werden konnte. Möglicherweise wird die 39 nt-RNA nur von La- und RRM1-Domäne von Larp7 gebunden, während die zusätzliche Interaktion mit dem RRM3-Bereich, welcher die Bindung zwischen Larp7 und 7SK weiter stabilisiert, nicht mehr ausgebildet werden kann.

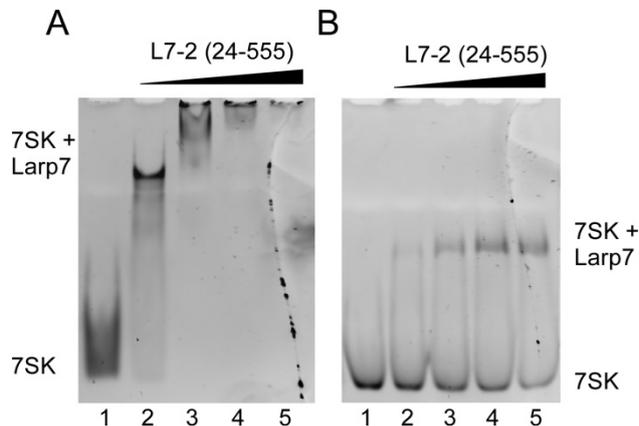


Abbildung 67: Einfluss von Heparin auf die Interaktion von L7-2 und der 39 nt 7SK RNA. A) Bindung von der kurzen 39 nt 7SK RNA und L7-2, wie schon unter UJM A aufgeführt B) Bei Zugabe von 5 µg Heparin in den Reaktionsansatz verschärfte sich die RNA-Bande. Auch hier konnte nur noch eine Komplexbande beobachtet werden, allerdings lag die RNA auch bei einem doppelten Überschuss L7-2 nicht vollständig verschoben vor.

Analytische Größenausschlusschromatographie der 39 nt 7SK RNA mit Larp7

Eine Bindung der 39 nt 7SK RNA und L7-2 wurde nun durch Größenausschlusschromatographie untersucht. Die RNA bildete ein scharf abgegrenztes Absorptionsmaximum bei einer Retentionszeit von 36 min (Abbildung 68 A, blaue Kurve). Die Absorption von L7-2 war dagegen schwächer und zeigte Ausschläge bei 23 und 28 min (Abbildung 68 A, rote Kurve). Um eine Interaktion von Protein und RNA beurteilen zu können, wurde nun die RNA mit einem Überschuss von L7-2 inkubiert. Da sich bei der Vermischung der Komponenten eine Trübung des Ansatzes zeigte, wurde die Probe durch Zentrifugation geklärt. In dieser Probe zeigten sich die gleichen Absorptionsmaxima bei 23 und 28 min wie bei der Probe von L7-2, jedoch war die Absorption dreifach erhöht (Abbildung 68 A, lila Kurve). Der Peak der RNA bei 36 min war in dieser Probe weder bei 280 nm, noch bei 260 nm sichtbar.

Von den drei Gelfiltrationsläufen wurden Fraktionen minutenweise gesammelt und in SDS- und Harnstoffgelen analysiert. Dabei konnte L7-2 (24-555) in den Fraktionen der Retentionszeiten 22-30 min mittels Coomassie Brilliant Blue angefärbt werden (Abbildung 68 B). Die gefällte 39 nt 7SK RNA fand sich nach Ethidiumbromidfärbung in den Fraktionen 35-42 (Abbildung 68 C).

Bei der Analyse des potentiellen Komplexes konnte L7-2 in der SDS-PAGE wie bereits zuvor in den Fraktionen 22-30 identifiziert werden (Abbildung 68 D). Die 39 nt 7SK RNA war dagegen zu einer deutlich früheren Retentionszeit verschoben worden und fand sich in den gleichen Fraktionen wie L7-2 (Abbildung 68 E). Damit konnte über analytische Größenausschlusschromatographie wie auch zuvor über das EMSA eine Bindung zwischen Larp7 und den 39 3'-Nukleotiden der 7SK snRNA gezeigt werden. Durch das Experiment wurde auch deutlich, dass eine Reinigung und Isolierung dieses Larp7-7SK Komplexes durch Größenausschlusschromatographie erreicht werden kann.

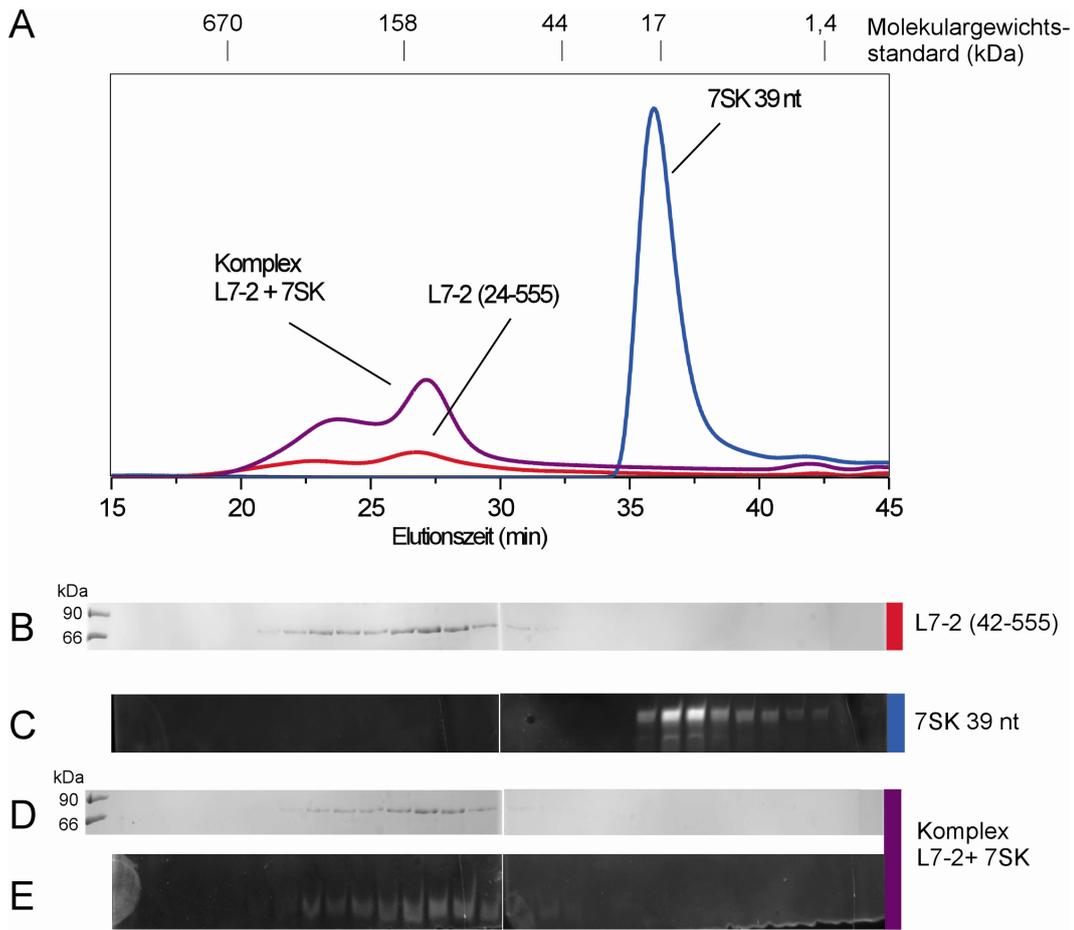


Abbildung 68: Interaktion von Larp7 (24-555) mit dem 39 nt-Fragment der 7SK snRNA. A) Die Absorptionskurve (280 nm) eines analytischen Gelfiltrationslauf unter Verwendung einer S200-Säule in 50 mM HEPES, pH 7,0, 350 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM β -Mercaptoethanol zeigte Absorptionsmaxima für L7-2 (100 μ g aufgetragen, rote Kurve) und der 39 nt 7SK snRNA (500 pmol, blaue Kurve) bei 23 und 28 min (L7-2) und 36 min (RNA). Bei der Inkubation von 39 nt 7SK mit einem Überschuss L7-2 konnte eine dreifache Erhöhung des L7-2-Absorptionspeaks nach 24 min erkannt werden, während der RNA-Peak bei 36 min verschwunden war. B) In der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE konnte L7-2 in den Fraktionen von 22-30 min gefunden werden. C) Im 10%-igen Harnstoffgel wurde die 7SK RNA bei 35-42 min durch EtBr angefärbt. D) In der SDS-PAGE der Elutionsfraktionen des Komplexes fand sich L7-2 unverändert bei 22-30 min. E) Im Harnstoffgel des potentiellen Komplexes eluiert die 7SK RNA nun wesentlich früher bei 22-30 min in den gleichen Fraktionen wie L7-2, was die Komplexbildung anzeigt.

Durch Optimierung der Reinigung von Larp7 wurde somit nukleinsäurefreies Protein gewonnen, welches die essentielle Grundlage für die quantitative Analyse der Bindung zwischen Larp7 und der 7SK snRNA bildete. In diesem Bindungsassay wurde die Interaktion von Larp7-Konstrukten mit 7SK snRNA und mit einem verkürzten 39 nt-Konstrukt nachgewiesen, welche zukünftig als minimales 7SK-Fragment eingesetzt werden kann. Die Zugabe von Heparin stellte dabei ein wirkungsvolles Mittel zur Unterbindung unspezifischer Interaktionen dar. Der Vergleich der Bindung von L7-2 an eine natürliche und eine zu 3'-UAG_{OH}-veränderte 7SK snRNA machte deutlich, dass die 3'-Poly-U-Sequenz wichtig für die Bindung von Larp7 an 7SK ist, jedoch auch zusätzliche Kontakte über die RRM3-Domäne zu anderen, bislang nicht identifizierten Bereichen auftreten.

5 Diskussion

5.1 Regulation des P-TEFb-Komplexes durch Brd4 CT

Die Arretierung der Transkriptionselongation als Kontrollpunkt der Transkription wird zunehmend als Schlüssel der Kontrolle der eukaryotischen Genexpression verstanden (Nechaev et al., 2010; Rahl et al., 2010). Die Charakterisierung regulatorischer Faktoren der Transkriptionselongation wie P-TEFb ist daher von großer Relevanz. In der vorliegenden Arbeit wurden mit den Proteinen Brd4 und Larp7 zwei Komponenten untersucht, welche ihrerseits als Teil des aktiven (Brd4) bzw. inhibierten (Larp7) P-TEFb-Komplexes die Aktivität von Cdk9 beeinflussen.

Aktivierung von P-TEFb durch Brd4

Ein Aspekt der dargelegten Arbeit war die Untersuchung der Aktivierung von P-TEFb durch das Protein Brd4. In einem quantitativen Kinaseassay konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Kinase Cdk9 durch die C-terminale Domäne (CT) von Brd4 stimuliert wurde. Dagegen wiesen die N-terminalen Bromodomänen (BD1 und BD2) von Brd4 keinen stimulatorischen Einfluss auf die Aktivität der Kinase auf. Durch die Wirkung von CT als Co-Faktor von P-TEFb wurde eine Stimulation der Phosphatgruppenübertragung erreicht, wodurch nach 15 min 40-50% mehr Phosphatgruppen auf ein CTD-Substrat übertragen worden war. Tat und die TAR RNA konnten dagegen im selben Zeitraum nur eine apparente Steigerung der Phosphatübertragung durch Beschleunigung der Reaktion um 30% erreichen. Dabei wurden erstmals isolierte Domänen zur Analyse der Interaktionen verwendet, um deren Einfluss separat untersuchen zu können. Bislang existierten widersprüchliche Daten zur Interaktion des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb mit Brd4, die sowohl eine Bindung von P-TEFb über die Bromodomänen (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005) als auch über CT von Brd4 (Bisgrove et al., 2007) beschrieben hatten. Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte ein Modell bestätigt werden, in welchem CT die Bindung an P-TEFb vermittelt (Bisgrove et al., 2007), während die Bromodomänen von Brd4 die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors zum Ort der Genexpression ermöglichen (siehe hierzu 4.2). Die durchgeführten Mutationsstudien verdeutlichten, dass die Stimulation von P-TEFb durch geladene Sequenzmotive bedingt wird. Den stärksten Einfluss hatte die Veränderung einer argininreichen Sequenz in CT, da deren Mutation zu Alaninen (R4A) die Aktivierung von P-TEFb eliminierte. Auch die RKRA-Mutante wies eine Reduktion der Aktivierungsfähigkeit um 40% auf und spricht für eine entscheidende Rolle der positiven Ladungen dieser Motive in der Stimulation von P-TEFb, möglicherweise durch Interaktion dieser Ladungen mit negativ-geladenen Bereichen von P-TEFb oder dem Substrat CTD. Die Mutation von R1337 zu Prolin unterband die Interaktion von CT und P-TEFb vollständig und unterstreicht die Bedeutung dieses R4-Motivs (Bisgrove et al., 2007). Aus einem Sequenzvergleich zwischen den C-Termini unterschiedlicher Organismen und BET-Familie-Proteinen (Bisgrove et al., 2007) wird zudem deutlich, dass die in der vorliegenden Arbeit mutierten Sequenzen hochkonserviert sind. Die Arginine der RxL- und R4-Sequenzabschnitte sowie

R1367 sind vollständig erhalten und sprechen für die Relevanz der mutierten Motive in der P-TEFb-Stimulation durch Brd4.

Als drittes Motiv wurde ein Dileucin in CT mutiert, welches als potentielles Analog zum Dileucinmotiv in Tat eine um 70% verminderte Aktivierung aufwies. Wie auch für das Tat-Protein in der EIAV Tat/TAR/CycT1-Struktur beobachtet (Anand et al., 2008), könnte diese LL-Sequenz an der Ausbildung hydrophober Interaktionen beteiligt sein und in helikale Bereiche von P-TEFb inserieren. Passend dazu wurde durch die Struktur des humanen Brd4 CTs im Komplex mit dem HPV-Protein E2 die Organisation der 20 C-terminalen Reste von Brd4 in einer amphipathischen Helix beschrieben, deren Dileucin-Motiv mit aromatischen Seitenketten von E2 eine hydrophobe Umgebung bildet (Abbate et al., 2006). Auch dieses Motiv ist als hydrophobes LL- oder LM-Motiv zwischen unterschiedlichen BET-Familie-Proteinen konserviert (Bisgrove et al., 2007). Eine RxL-Sequenz, welche als potentielles Cyclin-Bindungsmotiv vermutet wurde, hatte jedoch keinen Effekt auf die Aktivität von P-TEFb und macht eine Bindung an CycT1 über dieses Motiv unwahrscheinlich. Dazu passend wurde - wie im Folgenden diskutiert - keine Interaktion von CT und CycT1 festgestellt. Interessanterweise geht die Beeinträchtigung der Stimulationsfähigkeit der R4A- und RKRA-Mutanten mit einer stärkeren Veränderung der Sekundärstruktur zugunsten α -helikaler Bereiche einher als bei den anderen Mutanten. Diese Beeinträchtigung der Sekundärstruktur der Proteine könnte ebenfalls für die Verminderung der Aktivierung verantwortlich sein, wenn ungeordnete Bereiche in CT durch ihre Flexibilität mit Kinase oder Substrat interagieren können.

Interaktion von P-TEFb mit CT

Zur genaueren Charakterisierung der Aktivierung von P-TEFb durch CT wurde die Bindung der Proteine kalorimetrisch analysiert und eine mittelstarke Bindung mit einer Dissoziationskonstante K_d von 1,2 μ M bestimmt. Dieser K_d deckt sich mit einem abgeschätzten K_d von 0,1-1 μ M, welcher sich aus einer CT-Konzentrationsreihe zur Stimulation von P-TEFb ergab. Die Stöchiometrie von $n = 0,55$ deutet eine 2:1-Bindung an, aufgrund der hohen Abweichungen der Kurvenanpassung und einer möglicherweise verringerten Konzentration von P-TEFb durch Präzipitation sind jedoch weitere Experimente zur Beurteilung der tatsächlichen Stöchiometrie eines CT:P-TEFb-Komplexes notwendig. Interessanterweise konnte keine Bindung der Cyclinboxen von CycT1 (1-272) mit CT beobachtet werden, wodurch es wahrscheinlich erscheint, dass die Interaktion zwischen CT und P-TEFb (Cdk9 (1-340) und CycT1 (1-272)) auf eine Bindung von CT an Cdk9 zurückzuführen ist. Eine niederaffine Interaktion von CT und CycT1, die unter den gewählten Messparametern (Titration: 380 μ M vs. 38 μ M bei 15°C) nicht detektiert werden konnte, erscheint in Anbetracht der durchgeführten Mutationsstudien an CT-Motiven unwahrscheinlich: Die Mutation des RxL-Motivs in CT, welches ein Cyclin-Bindungsmotiv darstellen könnte (Schulman et al., 1998), hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von P-TEFb und widerspricht einer Beeinflussung der Aktivierung von P-TEFb durch Interaktion mit CycT1. Aufgrund des C-terminal verkürzten CycT1-Konstrukts der Cyclinboxen ist eine Interaktion zwischen Brd4 und CycT1 - wie beschrieben - jedoch nicht ausgeschlossen (Bisgrove et al., 2007) und könnte durch zentrale und C-terminale Bereiche (273-726) von CycT1 vermittelt werden.

Die zeitaufgelöste Analyse der Phosphatgruppenübertragung durch P-TEFb unter CT-Einfluss verdeutlichte, dass CT eine signifikante Steigerung der spezifischen Cdk9-Kinaseaktivität bewirkt, ohne dabei die Spezifität von P-TEFb zur Phosphorylierung von Ser2 zu beeinflussen. Zusammen mit den oben dargelegten Ergebnissen lässt dies einige Schlüsse auf die Bindungsstelle von CT auf P-TEFb zu: Da eine alleinige Bindung an P-TEFb über die Cyclinboxen nicht angenommen wird, scheint CT - zumindest größtenteils - an Cdk9 zu binden. Die Interaktion von CT mit Cdk9 kann durch eine Mutation S175D unterbunden werden, deren Kinaseaktivität jedoch nicht beeinflusst wird (Yang et al., 2005). Daher scheint CT mit S175 und benachbarten Regionen zu interagieren. S175 befindet sich im sogenannten Aktivierungssegment (Abbildung 69, orange Region), einer teils flexiblen, in Kinasen konservierten Sequenz, die die Aktivität der Kinase kontrolliert. In der inaktiven Form der Kinase blockiert das Aktivierungssegment die katalytische Spalte. Durch Phosphorylierung von T186 im Aktivierungssegment und der Bindung von CycT1 gibt das Aktivierungssegment die katalytische Spalte frei, in die ATP binden kann (Abbildung 69, gelb, Adams, 2001).

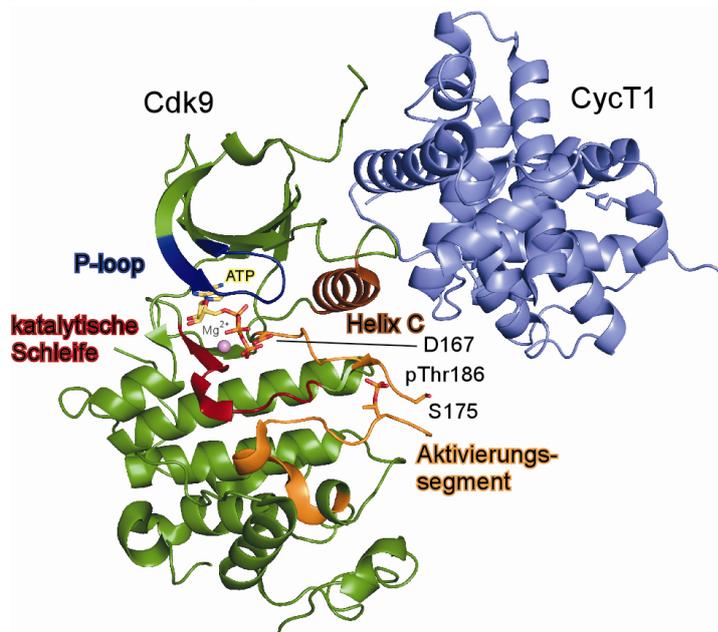


Abbildung 69: Katalytisch wichtige Regionen in Cdk9. Die katalytische Spalte in Cdk9 (grün) wird von dem P-Loop (blau) und der katalytischen Schleife (rot) gebildet, in welche ATP bindet und von den Schleifen sowie einem Mg^{2+} -Ion koordiniert wird. Das Aktivierungssegment (orange) reguliert durch die Bindung an CycT1 die katalytische Spalte und positioniert Helix C (braun) derart, dass diese ebenfalls zu der Koordination des ATP beitragen kann. Für die Aktivierung der Kinase ist die Phosphorylierung an Thr186 essentiell. Der für die Bindung von CT wichtige Rest S175 (Yang et al., 2005) liegt als Teil des Aktivierungssegments in einer flexiblen Schleife (PDB-Code 3BLQ, Baumli et al., 2008).

Die flexible Schleifenstruktur des Aktivierungssegments von Cdk9, in welcher sich Ser175 befindet, ist in der Kristallstruktur von P-TEFb C-terminal von Ser175 nicht aufgelöst und ihre genaue Position daher unklar (Abbildung 69; PDB-Code 3BLQ, Baumli et al., 2008). Da durch CT die Spezifität von P-TEFb für Ser2 der CTD nicht verändert wird, scheint keine Interaktion mit der katalytischen Spalte aus dem P-Loop (Abbildung 69, blau) und der katalytischen Schleife (Abbildung 69, rot) vorzuliegen, welche die Bindung des ATPs und Positionierung des Substrats vermitteln und Einfluss auf die Spezifität nehmen könnten. Durch die Wirkung von Tat soll dagegen die P-TEFb-Spezifität von Ser2 auf Ser2/Ser5 erweitert werden (Zhou et al., 2000), und ein essentieller Rest D167, dessen Mutation die Interaktion zwischen P-TEFb und Tat/TAR sowie die Kinaseaktivität unterdrückt, liegt mitten in der katalytischen Spalte nahe der γ -Phosphatgruppe des ATPs (Fong und Zhou, 2000). Weder D167 noch die Phosphorylierung von Cdk9 an Thr186 spielt dagegen für die Bindung von CT eine Rolle (Yang et al., 2005). Das Aktivierungssegment positioniert auch die Helix

C, welche an der Koordination der Phosphatgruppen des ATPs beteiligt ist und mit CycT1 interagiert (Baumli et al., 2008). Eine Interaktion von CT mit Ser175 und dessen Umgebung könnte einerseits das Aktivierungssegment in der aktivierten Position, in der es die katalytische Spalte freigibt, stabilisieren und somit die Kinase dauerhaft aktivieren. Dadurch würde auch die Helix C in ihrer Position gefestigt, welche zusammen mit dem Aktivierungssegment für die Bindung des zu phosphorylierenden Substrats verantwortlich ist (Johnson 2009). Durch die Wirkung von CT könnte eine stabile Bindung der CTD an P-TEFb erreicht und eine optimale Kinaseaktivität durch vorliegendes Substrat (CTD) und Cosubstrat (ATP) gewährleistet werden.

Obwohl das virale Tat-Protein und die CT-Domäne von Brd4 sequenzielle und funktionelle Parallelen aufweisen, scheinen beide unterschiedliche Mechanismen zur Manipulation des P-TEFb-Komplexes anzuwenden: Während Tat in einer TAR-abhängigen Weise über eine Bindung an CycT1 sowie durch Einflüsse auf die katalytische Spalte (D167) P-TEFb transaktiviert, bindet CT vermutlich an Cdk9 und erreicht ohne eine akzessorische RNA (TAR oder 7SK snRNA) oder DNA eine stärkere Aktivierung als Tat/TAR. Dies schließt jedoch nicht aus, dass eine andere, bislang nicht identifizierte RNA eine zusätzliche Steigerung der Aktivität von P-TEFb zusammen mit CT ermöglichen könnte.

Aufhebung der Hxm1-vermittelten Inhibition von P-TEFb durch CT

Bei der Untersuchung der Einflüsse von Brd4-Domänen auf den inhibierten P-TEFb-Komplex (P-TEFb:Hxm1 (200-359)) konnte eine Aktivierung durch Brd4 für 10 μM CT nachgewiesen werden, welche 85% der Kinaseaktivität von 0,1 μM P-TEFb trotz Anwesenheit von 2 μM Hxm1 wiederherstellte. Auch hier hatten die Bromodomänen wie GST als Negativkontrolle keinen Einfluss auf die Inhibition. Die Tatsache, dass aus dem inhibierten Zustand durch CT nur 85% des für P-TEFb gemessenen Phosphatgruppentransfers erreicht werden konnte, ist erstaunlich, da CT im fünffachen Überschuss (10 μM) im Vergleich zu Hxm1 (2 μM) eingesetzt wurde, jedoch trotz dieses Überschusses keine vollständige Aufhebung der Inhibition und anschließende Aktivierung von P-TEFb erreicht worden ist. Dies deutet auf eine stärkere Bindung von Hxm1 an P-TEFb als von CT an P-TEFb hin, wodurch die Inhibition durch Hxm1 effektiver wäre als die Aktivierung durch CT. Tatsächlich wurde eine Dissoziationskonstante von 0,3 μM für die Bindung von Hxm1 (194-359) an P-TEFb berichtet (Czudnochowski, 2009). Hxm1 (194-359) interagiert jedoch zusätzlich mit geringer Affinität mit den Cyclinboxen von CycT1 ($K_d = 1,7 \mu\text{M}$; Czudnochowski, 2009), was der Affinität der CycT1-Bindungsdomäne TBD von Hxm1 mit CycT1 von 1,2 μM entspricht (Schulte et al., 2005; Schonichen et al., 2010). Die hohe Affinität von Hxm1 zu P-TEFb von 0,3 μM beinhaltet also sowohl die Bindung an CycT1 als auch an Cdk9. Dagegen scheint aufgrund der durchgeführten Experimente CT hauptsächlich über Cdk9 ($K_d: 1,2 \mu\text{M}$), nicht aber über CycT1 (1-272) mit P-TEFb zu interagieren. Bei einer Konkurrenz von CT und Hxm1 um die Bindung an P-TEFb könnte CT daraus folgend selbst im Überschuss eingesetzt nur die Interaktion von Hxm1 und Cdk9 aufheben, während die Bindung von Hxm1 an CycT1 unbeeinflusst bliebe. Entsprechend konnte keine Verdrängung von Hxm1 TBD durch CT von immobilisiertem CycT1 beobachtet werden. Diese Beobachtungen sprechen für die Bildung eines quaternären Komplexes aus Cdk9:CycT1:Hxm1:CT, in dem CT und Hxm1 um die

Interaktion mit Cdk9 kompetitieren. Da für Hxm1 eine Besetzung der ATP-Bindungstasche durch Reste des zentralen PYNT-Motivs diskutiert wird (Michels et al., 2004; Byers et al., 2005, Czudnochowski, 2009), während CT mit dem Aktivierungssegment interagieren soll (Yang et al., 2005), scheint ein direkter Verdrängungsmechanismus unwahrscheinlich und spricht für eine indirekte Verdrängung von Hxm1 durch Begünstigung des aktiven Zustandes mit ATP- und Substratbindung durch CT.

Die Inhibition von P-TEFb durch Hxm1 (200-359) stellt eine artifiziiell starke Bindung dar, die aus der Verkürzung von Hxm1 resultiert, während natives Hxm1 etwa fünffach schwächer P-TEFb inhibiert (Czudnochowski, 2009) und vermutlich auch schwächer an P-TEFb bindet. Durch die geringere Affinität kann CT die Inhibition von P-TEFb durch Wildtyp-Hxm1:7SK snRNA vollständig aufheben und P-TEFb stimulieren. Auch diese Aktivierung durch CT wird durch die Anwesenheit der RNAs TAR und 7SK nicht begünstigt. Die Auswirkung der erstellten Mutanten von CT auf den inhibierten Komplex war noch ausgeprägter als auf unbeeinflusstes P-TEFb, da keine der Mutanten eine Wiederherstellung der Kinaseaktivität vergleichbar zu Wildtyp-CT vermittelte. LLAA, R4A und RKRA waren außerstande, die Inhibition aufzuheben, während die RxL-Mutante, die zuvor als einzige keinen Einfluss auf die Aktivierung von P-TEFb durch CT hatte, die Kinaseaktivität von 5% auf 18% wiederherstellte. Dies entspricht einem Fünftel der Aktivierung durch CT. In der Vergangenheit ist ein positiver Ladungsbereich in P-TEFb als mögliche Interaktionsfläche für Hym1 diskutiert worden (Czudnochowski, 2009). Dieser Bereich wird u.a. durch das Aktivierungssegment gebildet, und es ist denkbar, dass CT in bislang unbekannter Weise diesen Bereich überdeckt und seine eigenen positiven Ladungen Hxm1 präsentiert. Hierdurch würde die Interaktion von Hxm1 mit P-TEFb deutlich geschwächt. Bei Fehlen dieser Ladungen durch Mutation würde dies nicht mehr möglich sein und die Bindung an P-TEFb nicht mehr beeinträchtigt.

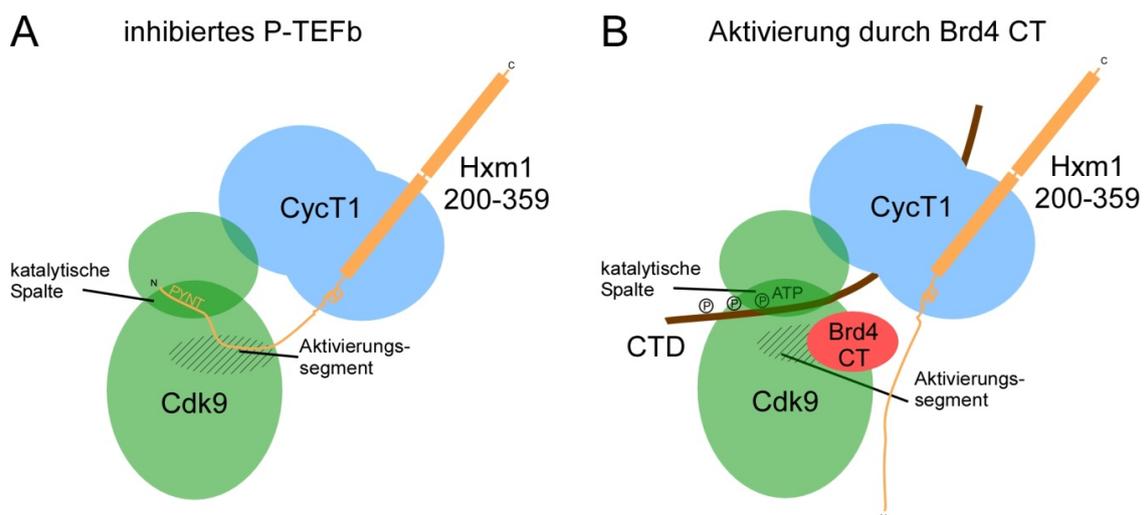


Abbildung 70: Modell der *in-vitro* Aktivierung von P-TEFb aus der Hxm1-vermittelten Inhibition.
 A) Bei der Inhibition von P-TEFb durch Hxm1 (orange) wurde eine Interaktion von Hxm1 sowohl über CycT1 (blau) als auch über positiv-geladene Bereiche in Cdk9 (grün) diskutiert, die teilweise im Aktivierungssegment liegen (Czudnochowski, 2009). Die ATP-Bindungstasche von Cdk9 könnte über das PYNT-Motiv auf bislang nicht geklärte Weise die Kinaseaktivität inhibieren. B) Durch die Bindung von Brd4 CT (rot) an das Aktivierungssegment wird Hxm1 von diesem Bereich verdrängt und kann nun nicht mehr inhibitorisch auf Cdk9 wirken. ATP kann nun wieder gebunden, und Phosphatgruppen auf das CTD-Substrat (braun) übertragen werden.

Es erscheint jedoch wahrscheinlicher, dass die teils deutlichen Einschränkungen der Aktivierungsfähigkeit von CT durch die Mutationen die Interaktion von CT und P-TEFb schwächt. Im Falle einer Konkurrenz dieser Mutanten mit Hxm1 um die Bindung an P-TEFb würde durch die geschwächte Bindung der CT-Mutanten das Gleichgewicht im quaternären Komplex P-TEFb:Hxm1:CT zugunsten einer Inhibition von P-TEFb durch Hxm1 verschoben (Abbildung 70). Ein solcher quaternärer Komplex scheint jedoch *in vivo* nicht dauerhaft vorzuliegen, da Brd4 und Hxm1 nicht gemeinsam an P-TEFb gebunden gefunden wurden (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Die dargelegten Ergebnisse ergänzen somit das bislang bekannte Modell der Aktivierung von P-TEFb durch CT, in dem CT durch Bindung an das Aktivierungssegment von P-TEFb die Kinase Cdk9 in ihrer aktiven Konformation stabilisiert und eine Bindung des Substrats CTD begünstigt. Die spezifische Aktivität von P-TEFb kann durch diese Einwirkung gesteigert und die Phosphorylierung der CTD beschleunigt werden. Der inhibierte P-TEFb-Komplex kann durch Aufhebung der Inhibition durch Hxm1 aufgelöst werden, wobei hierbei sowohl positive Ladungen in CT als auch die Stabilisierung der aktiven Konformation von Cdk9 eine Rolle spielen können. Dies bleibt aufgrund der Unkenntnis des detaillierten Mechanismus' der Inhibition durch Hxm1 unklar und benötigt die strukturelle Klärung der Bindung von Hxm1 an P-TEFb. Auch eine endgültige Aufklärung der Bindung von CT an P-TEFb durch strukturelle Methoden steht noch aus. Möglicherweise spielen bei der Aufhebung der Inhibition von P-TEFb bislang unbeachtete Bereiche in Brd4 eine Rolle, die kompetitiv zu Hxm1 an CycT1 binden könnten. Die Funktion der ET-Domäne im zentralen Bereich von Brd4 ist trotz vorliegender NMR-Struktur (Lin et al., 2008) bislang ungeklärt, sie wurde jedoch als Protein-Protein-Bindungsdomäne, beispielsweise im Kontext des Kaposi's Sarcoma-assoziierten Herpesvirus KSHV, beschrieben (Lin et al., 2008; You et al., 2006). Zukünftige Untersuchungen könnten sich der Frage annehmen, ob sie oder andere Bereiche von Brd4 eine Rolle bei der Verdrängung von Hxm1 von CycT1 spielen, welche aufgrund des exklusiven zellulären Auftretens von P-TEFb in Hxm1- oder Brd4 gebundener Form naheliegen (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005).

5.2 Interaktionen der Bromodomänen von Brd4 mit modifizierten Histonequenzen

Strukturen der Bromodomänen von Brd4

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Bromodomänen von Brd4 nicht an der direkten Aktivierung von P-TEFb beteiligt sind, wurde ihre Rolle in der Rekrutierung des Komplexes an den Ort der Transkription untersucht. Dazu wurde zunächst die Bindung der Bromodomänen von Brd4 an acetylierte Lysine in Peptiden der Histone H3 und H4 strukturell analysiert. Die Kristallstrukturen von BD1 und BD2 wiesen die konservierte Bromodomänenfaltung aus vier α -Helices sowie eine Bindungstasche zur Erkennung von Acetyllysinen im Histonkontext auf. Während diese Faltung in BDs unterschiedlicher Proteine und Organismen konserviert ist, blieb eine Dimerisierung von Bromodomänen bislang umstritten. Da viele Bromodomänen-Proteine jeweils zwei BDs enthalten, teilweise in sequenzieller und

räumlicher Nähe wie im Falle des Transkriptionsfaktor TAF_{II}250 (Jacobson et al., 2000), könnten BDs als Dimer an benachbarte Acetyllysine auf Histonen binden und die schwachen Affinitäten von isolierten BDs an Histonfragmente apparent erhöhen. Wenngleich die Homodimerisierung gleicher BDs (BD1-BD1) für Brd2 beschrieben und aufgrund der hohen Sequenzkonservierung von BET-Familie BDs auch für Brd4 BDs prognostiziert wurde (Nakamura et al., 2007), konnte weder in der vorliegenden Arbeit noch von anderen Gruppen eine Dimerisierung von Brd4 BDs nachgewiesen werden (Liu et al., 2008; Vollmuth et al., 2009). Zwar konnte die frühe Retentionszeit von Brd4 BD2 nicht erklärt werden, die dargelegten Mutationsdaten machen jedoch eine Dimerisierung von BD2, wie sie in der Kristallpackung beobachtet wurde, unwahrscheinlich. Das weiter reduzierte Elutionsverhalten der R445A/D449A-Doppelmutante deutet ebenfalls nicht auf die Auflösung eines Dimers hin. Vielmehr scheint ein erhöhter hydrodynamischer Radius der Mutante, möglicherweise durch eine Destabilisierung der α C-Helix, vorzuliegen. Eine direkte Interaktion zwischen BD1 und BD2, wie sie für Brd4 erwähnt wurde (Huang et al., 2009), konnte durch analytische Gelfiltration und ITC-Messungen nicht bestätigt werden (Daten nicht dargestellt) und machen eine BD1-BD2-Heterodimerisierung der BDs von Brd4 unwahrscheinlich.

Interaktion von Brd4 BDs mit acetylierten Histonpeptiden

Die Strukturen von Komplexen aus BDs von Brd4 und drei oktameren Peptiden der Histone H3 und H4 wurden analysiert und parallel die thermodynamischen Parameter der Bindung der BDs an diese Histonfragmente mit Dissoziationskonstanten (K_d 's) von 100-300 μ M bestimmt. Während auch andere Bromodomänenproteine Dissoziationskonstanten zu acetylierten Histonpeptiden im μ M-Bereich aufweisen (Dhalluin et al., 1999; Jacobson et al., 2000), wurden für Brd4 und das nah verwandte Brd2 K_d 's im niedrigen mM-Bereich beschrieben (Huang et al., 2007; Liu et al., 2008; Umehara et al., 2010). Diese um den Faktor 10 abweichenden Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit beruhen vermutlich auf der Verwendung anderer Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (NMR-Titration in Huang et al., 2007 und Liu et al., 2008; bzw. Oberflächenplasmonresonanz in Umehara et al., 2010). Die geringe Affinität einer einzelnen BD zu Acetyllysinen in Histonen verdeutlicht die Notwendigkeit kooperativer Effekte durch Bindung mehrerer BDs an Histone zur Erhöhung der apparenten Affinität. Bei genauer Betrachtung der bestimmten Dissoziationskonstanten konnte eine leichte Bevorzugung der Bindung von H3-K14(ac) durch BD1 (K_d von 118 μ M) bzw. der H4-Peptide H4-K5(ac) und H4-K16(ac) (K_d 's von 107 und 133 μ M) festgestellt werden, welche eine Spezifität von BD1 für die Bindung an Histon 3 und von BD2 zu Histon H4 anzeigen könnte. Die vorliegenden Kristallstrukturen und Bindungsdaten können diese Spezifität beispielsweise durch die stärkere Ausprägung von negativen Ladungen in der elektrostatischen Oberfläche von BD2 im Gegensatz zu BD1 jedoch nicht erklären, da weder eine Korrelation der Ladungen der bevorzugten Acetyllysinpeptide zu der Ladungsverteilung der BDs erkennbar ist, noch die das Acetyllysin umgebenden Reste in den Kristallstrukturen aufgelöst sind, wodurch die Beteiligung dieser Reste an der Bindung der BD nicht näher analysiert werden konnte.

Anhand der Kristallstruktur von BD1 mit dem H3-K14(ac)-Peptid wurde deutlich, dass die zweiteilige Natur der Acetyllysinverzweigung essentiell für die Interaktion mit der BD-

Bindungstasche ist: Einerseits werden Wasserstoffbrücken mit N140 und dem Wassernetzwerk innerhalb der Bromodomäne ausgebildet, andererseits hydrophobe Wechselwirkungen mit Resten der Bindungstasche eingegangen. Während die herausragende Bedeutung des Asparagins in BDs für die Bindung von Acetyllysin lange bekannt war (Zeng und Zhou, 2002), wurde hier deutlich, dass auch das Wassernetzwerk innerhalb der Bindungstasche eine wichtige Rolle spielt. In allen bekannten Kristallstrukturen von BDs sind diese Wassermoleküle positionell konserviert (Brd2 BDs (1XOJ, 2DVV), Brd3 BDs (2NXB, 2OO1), Gcn5 (1E6I), TAF_{II}250 (1EQF), PCAF (3GG3), Rsc4 (2ROS)). Nur durch die gleichzeitige Ausbildung der Wasserstoffbrücken zu N140 und zu den konservierten Wassermolekülen ist eine exakte Positionierung des Acetyllysin möglich. Der hydrophobe Charakter der Methylgruppe der Verzweigung ist ebenfalls von großer Bedeutung für die Interaktion des Acetyllysin mit der Tasche der BD, da sie über fünf hydrophobe Wechselwirkungen zu den Resten P82, F83, V87 und I146 stabilisiert wird. Da der hydrophobe Charakter von Resten an diesen Positionen sowohl in BET-Familie- als auch anderen Bromodomänen-Proteinen erhalten ist (Abbildungen 35 und 58), scheinen auch diese bislang wenig beachteten Wechselwirkungen charakteristisch für die Interaktion von BDs mit Acetyllysin zu sein.

Interaktion von Nicht-Acetyllysin-Peptiden mit BDs

Bei der Analyse der Kristallstruktur von BD2 stach die ungewöhnliche Bindung des N-Terminus eines BD2-Moleküls in die Bindungstasche des Nachbarmoleküls hervor. Eine solche Interaktion von Nicht-Acetyllysinresten mit einer Bromodomäne wurde in ähnlicher Form auch in der Struktur der Tandembromodomäne von TAF_{II}250 beobachtet, bei der die benachbarte Bindungstasche von einem Glycin und einem Threonin gebunden wurde (PDB-Code: 1EQF; Jacobson et al., 2000). Beide Fälle stellen eindeutig ein Kristallisationsartefakt dar, welches im Fall von Brd4 BD2 vermutlich die sehr hohe atomare Auflösung der Struktur von 1,2 Å ermöglichte. In der Struktur von BD1 verläuft der N-Terminus entlang der Helices α A und α B bis zur ZA-Schleife. Im Hefeprotein Rsc4 wird ein N-terminaler Bereich um K25 von Gcn5 acetyliert und interagiert im Anschluss intramolekular mit einer der Tandembromodomänen von Rsc4. Diese Bindung führt zur Autoinhibition des Proteins, das nun nicht mehr mit Histonen assoziieren kann (PDB-Code 2ROS; VanDemark et al., 2007). Brd4 enthält N-terminal zu BD1 zwar keine Lysine, die acetyliert werden könnten, jedoch eine Glutamin- und Alanin-reiche Region, welche sich für eine Bindung in die relativ weit geöffnete Bindungstasche der BDs von Brd4 eignen würde. Möglicherweise könnte ein weiter verlängerter N-Terminus von BD1 bis in die Bindungstasche ragen, ähnlich, wie es in der Struktur von BD2 auftrat. Wenn auf diese Weise Glutaminreste wie in BD2 oder in TAF_{II}250 die Bindungstasche von BD1 besetzen könnten, könnte dies eine Regulation der Histoninteraktion ähnlich der Autoinhibition von Rsc4 darstellen. Glutamine würden sich zusätzlich zu ihrer geeigneten Lage N-terminal im Protein auch aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu Acetyllysin für eine Bindung eignen. Aus diesem Grund wurde jene N-terminale Glutaminsequenz im Kontext eines Oktapeptids Brd4 (33-38) auf eine Bindung in die Bindungstasche von BD1 im Kristall untersucht. Dabei konnte jedoch keine Bindung dieser Glutamine festgestellt werden, was nicht für einen Autoregulationsmechanismus durch diese Reste spricht. Ein längeres BD1-Konstrukt (28-168), welches diese Sequenz

enthält, konnte nicht kristallisiert werden. Alternativ könnte ein C-terminales K1111 in Brd4, dessen Acetylierung kürzlich beschrieben wurde (Choudhary et al., 2009), ebenfalls eine Autoregulation von Brd4 vermitteln. Für eine zukünftige Analyse dieses potentiellen Regulationsmechanismus von Brd4 stellen die dargestellten Bindungsexperimente einen idealen Ausgangspunkt dar.

Auch für die Bindung der in Histonen auftretenden Aminosäure Citrullin, welche in ihrer Seitenkettenlänge und Gestalt der von Acetyllysin ähnelt und für die bislang keine Bindungsdomäne bekannt ist, konnte kein Anzeichen für eine Bindung an Brd4 BDs gefunden werden. Ob hierbei die um eine Methylengruppe verkürzte Seitenkette oder der abweichende chemische Charakter der Verzweigung mit zwei polaren Gruppen (Sauerstoff auf der einen, NH₂ auf der anderen Verzweigungsseite) eine Bindung verhindert, ist nicht klar. In der Kristallstruktur von BD2, in welcher ein Methionin artifiziell in die Bindungstasche eines benachbarten Moleküls band, wurde das Peptidrückgrat weiter in die Bindungstasche inseriert als im Fall der Bindung von Acetyllysinpeptiden an BDs (Abbildung 41 B). Dies könnte auch für das Citrullinpeptid möglich sein. Jedoch ist aufgrund der bereits diskutierten Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen der Acetyllysinverzweigung mit den Resten P82, F83, V87 und I146 in BD1 eine Interaktion mit Citrullin unwahrscheinlich. Die polare Aminogruppe des Citrullins anstelle der hydrophoben Methylgruppe könnte in der hydrophoben Umgebung keine stabilisierenden Kontakte eingehen und somit nicht zur Bindung des Peptids beitragen. Somit konnte eine Erkennung von Citrullin im Histonkontext durch Brd4 BDs ausgeschlossen werden. Auch die Bindung eines Glutaminmotivs, wie es durch das Peptid Brd4 (33-38) untersucht wurde, erscheint in Anbetracht der beschriebenen Notwendigkeit von polaren und hydrophoben Kontakte unwahrscheinlich und konnte dazu passend nicht nachgewiesen werden.

Bindung von Propionyllysin und Butyryllysin durch Brd4 BDs

Die Entdeckung der Propionylierung und Butyrylierung von Lysinen in den Histonen H3 und H4 stellte eine Erweiterung des Histon-Codes dar, deren Bedeutung unklar ist. Zwar konnten mit P/CAF, p300, CREB-*binding-protein* und anderen HATs Enzyme der Übertragung der Acylgruppen von Propionyl-CoA bzw. Butyryl-CoA identifiziert werden (Chen et al., 2007; Leemhuis et al., 2008; Garrity et al., 2007), während die Deacetylierung von HDACs wie Sirt1-3 erfolgen kann (Garrity et al., 2007; Smith und Denu, 2007), jedoch ist die Erkennungsdomäne für Propionyllysin und Butyryllysin unbekannt. In der vorgelegten Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Propionyllysine im Kontext von H3 von den beiden BDs von Brd4 erkannt und gebunden werden können. Die ermittelten Affinitäten der Interaktion mit BD1 zeigten für die Position H3-K14 eine Verschlechterung des K_d's um den Faktor drei. Für BD2 wurde eine leichte Verbesserung des K_d's beobachtet. Da Acetylierungen an unterschiedlichen Positionen von H3 und H4 zu ähnlichen Schwankungen der Affinitäten zwischen 107 μM (BD2 mit H4-K5(ac)) und 327 μM (BD2 mit H3-K14(ac)) führten, kann hier von unverändert schwachen Affinitäten im Vergleich zu acetylierten Histonmotiven ausgegangen werden. Auch die Affinitäten einer Propionylierung an Position 23 von H3 (H3-K23(prop)), die in der Leukämie-Zelllinie U937 auftrat (Lui et al., 2009), zeigte keine deutliche Veränderung der Affinität im Vergleich zu acetylierten Lysinen. Dabei deutet sich

eine leichte Präferenz der Propionylierung zu BD2 (213 μM und 208 μM) über der zu BD1 (337 μM und 380 μM) an.

Im Gegensatz zur Propionylierung konnte für die Butyrylierung des Lysins K14 in H3 unter *in vitro*-Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Dies spricht unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentrationen in den ITC-Messungen für eine abgeschätzte Affinität von $>600 \mu\text{M}$. Überraschenderweise konnten durch die Inkubation von BD1-Kristallen trotzdem Komplexe von Propionyllysins- und Butyryllysinspeptiden mit BD1 erstellt und strukturell beschrieben werden, die auch eine Bindung von butyrylierten Histonmotiven an BD1 nachwies. Die Diskrepanz zwischen der ITC-Messung, die keine Bindung von BD1 an H3-K14(but) zeigte, und der Komplexbildung im Kristall in Anwesenheit von 26 mM Peptid legt eine millimolare Affinität des Butyryllysinspeptids zu BD1 nahe. Somit konnte BD1 von Brd4 als Erkennungsdomäne für propionylierte und butyrylierte H3-Motive nachgewiesen werden. Unklar ist, ob diese Bindung von Butyryllysins auch auf BD2 übertragbar ist. Da jedoch alle Reste, von denen die Interaktion von Acetyllysins abhängt, in BD1 und BD2 konserviert sind, ist auch eine Erkennung von Butyryllysins durch BD2 wahrscheinlich. Gleichzeitig konnte mit den vorliegenden Bindungs- und Strukturdaten erstmals die Interaktion von BDs mit Nicht-Acetyllysinsmotiven beschrieben werden, die eine Erweiterung der Spezifität von Bromodomänen bedeutet. Zwar wurde eine Bindung von Acetylhistidin, Acetylhistamin und N-Methylacetamid an die Bromodomänen von Gcn5 und P/CAF ermittelt, diese Reste zeichnen sich jedoch durch Variation des Peptidrückgrates, nicht der Acetylverzweigung, aus (Dhalluin et al., 1999; Hudson et al., 2000). Somit sind Propionyllysins und Butyryllysins die ersten Aminosäuren, die trotz Abweichungen der Seitenkette von Acetyllysins in die Tasche von Bromodomänen binden.

Die Überlagerung der drei Strukturen von BD1 mit gebundenen Acylpeptiden zeigte, dass alle drei Acylreste innerhalb der Tasche die gleiche Position einnehmen. Als Konsequenz knicken die verlängerten Acylketten von Propionyl- und Butyryllysins ein, um möglichst wenig Platz einzunehmen und das konservierte Wassernetzwerk nicht zu beeinträchtigen. Die ausgebildeten Kontakte von Propionyllysins zu BD1 sind in Abbildung 71 schematisch aufgeführt, zudem wurden die Kontakte der Seitenkettenreste ebenfalls dargestellt.

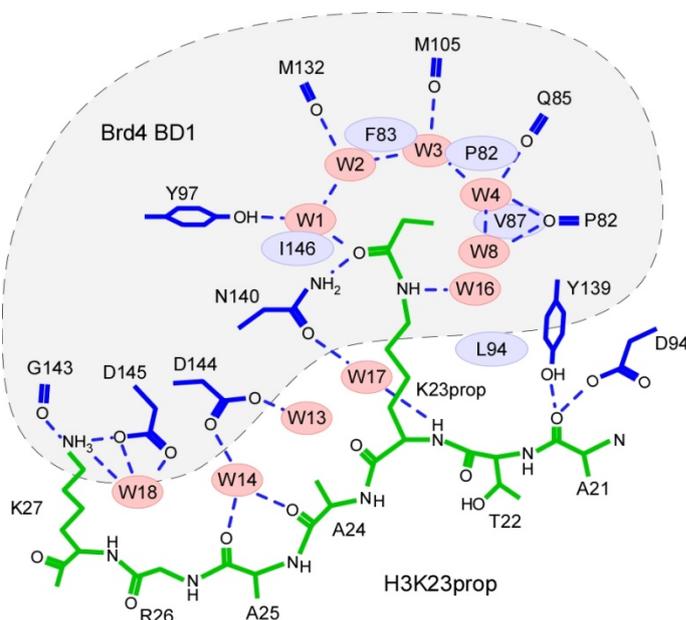


Abbildung 71: Schematische Darstellung der Interaktionen von Propionyllysins mit BD1. Propionyllysins (grün) wird innerhalb der Bindungstasche durch Wasserstoffbrücken zu N140 und dem Wassermolekül (rot) W1 koordiniert. Dieses Wasser ist Teil des konservierten Netzwerks, welches die Bindungstasche füllt. Daneben wird die hydrophobe Ethylengruppe von hydrophoben Resten (blau) stabilisiert. L94 stabilisiert die Seitenkette des Propionyllysins. Die benachbarten Reste des Peptids werden durch Wasserstoffbrücken teils direkt, teils über Wassermoleküle vermittelt, ebenfalls positioniert und stellen ein Beispiel für die multiple Interaktion von Histonfragmenten mit Bromodomänen dar.

Die abgeknickte Form des butyrylierten Peptids hat eine energetisch ungünstige Annäherung der terminalen Methylgruppe zum Stickstoff des Seitenkettenamids bis auf 2,2 Å zur Folge. Aus der Position der modifizierten Reste lässt sich jedoch nicht direkt ersehen, warum Butyryllysin schlechter an BD1 bindet als Acetyl- oder Propionyllysin. Erst eine detaillierte Betrachtung der Interaktionen der Acyllysine mit Resten der BD zeigt, dass Propionyllysin genau wie Acetyllysin von den hydrophoben Resten der Bindungstasche positioniert wird. Die Verzweigung des Propionyllysins wird durch das PF-Motiv stabilisiert, genau wie die Seitenkette des Restes durch L94. In Butyryllysin sind die Interaktionen zu den entsprechenden Resten durch größere Abstände und ungünstige Positionierungen geschwächt. Vermutlich führen die Beeinträchtigungen der Bindung der Verzweigung zu einer Abweichung des Verlaufs der Seitenkette, wodurch die Interaktion zu L94 destabilisiert wird und in einer reduzierten Affinität mündet. Eine weitere Verlängerung der Acylkette zu Valeroyllysin führt dazu passend zu einer Unterbindung der Interaktion im Kristallsystem. Diese Verringerung der Affinität durch Beeinträchtigungen der hydrophoben Kontakte ist überraschend, da bei der Bindung eines sterisch größeren Restes wie Butyryllysin in die Bindungstasche von BDs vermutet wurde, dass dies eine Insertion der verlängerten Acylverzweigung in das Wassernetzwerk bewirken könnte. Die Verdrängung einzelner Wassermoleküle hätte eine Steigerung der Affinitäten durch eine Erhöhung der Entropie der Bindung und Ausbildung zusätzlicher hydrophober Kontrakte zur Folge. Die starke Vernetzung der Wassermoleküle in der Bindungstasche scheint jedoch eine Verdrängung einzelner Wasser zu verhindern. Vermutlich könnte eine Insertion in diesen Bereich der BDs nur durch größere funktionelle Gruppe erfolgen, die gleichzeitig mehrere Wassermoleküle verdrängen müsste. Eine solche Gruppe könnte dann eine deutlich gesteigerte Bindungsaffinität aufweisen. Die verwendeten Verlängerungen der Acylverzweigung werden dagegen von der Bromodomäne toleriert, solange diese nur den Raum einnehmen, der auch Acetyllysin zur Verfügung steht. Wird dieser Raumbedarf - wie im Falle von Valeroyllysin - überschritten, kann die Modifikation des Lysins nicht mehr in die Bromodomäne binden. Aufgrund der angeführten hohen Konservierung der entscheidenden Reste (P82, F83, V87, L94 und I146) und des Wassernetzwerkes in BDs unterschiedlicher Proteine und Spezies ist eine Übertragung dieses Bindungsmechanismus auch auf andere BD-Proteine möglich und führt zu der Hypothese, dass alle Bromodomänen-enthaltenden Proteine Propionyl- und Butyryllysin akzeptieren und binden, wenn auch mit reduzierter Affinität.

Mögliche Bedeutung des Einbaus von Propionyl und Butyryl in Histone

Die beschriebenen Bindungen von Propionyl- und Butyryllysin an BDs wurden durch zwei *in vitro* Systeme mit isolierten Proteinen und Peptiden untersucht, so dass nicht gesichert ist, ob diese Interaktionen auch in einem physiologischen System relevant ist. Jedoch wurden beide Modifikationen in isolierten Histonfragmenten von Mensch und Hefe nachgewiesen, und die Propionylierung von Lysinen konnte auch in Zellen der humanen Leukämieinie U937 identifiziert werden (Liu et al., 2009). In Ermangelung von *in vivo* Daten zur Lokalisation von BD-Proteinen ist jedoch die physiologische Auswirkung unklar. Die Propionyl- bzw. Butyrylgruppe wird durch HATs von Propionyl-CoA und Butyryl-CoA auf Lysine in Histonen oder anderen Proteinen übertragen (Chen et al., 2007; Garrity et al., 2007; Leemhuis et al.,

2008). Hauptquelle von Propionyl-CoA und Butyryl-CoA ist die β -Oxidation ungradzahliger Fettsäuren in Mitochondrien, zudem ist Propionyl-CoA ein Abbauprodukt der Aminosäuren Isoleucin, Methionin, Threonin und Valin. Sowohl Propionyl-CoA als auch Butyryl-CoA sind zudem Zwischenprodukte in der Fettsäuresynthese im Zytosol (Chen et al., 2007). Bei Verwendung der metabolischen Zwischenprodukte Propionyl- oder Butyryl-CoA anstatt Acetyl-CoA könnten sich - unter der Annahme, dass Bromodomänen auch im zellulären Kontext Propionyl- bzw. Butyryllysine binden können, wenn auch mit verringerter Affinität - zwei alternative Auswirkungen auf den Organismus und dessen Regulation ergeben: Einerseits könnte der Einbau dieser seltenen Modifikationen in Histone ein direktes Signal sein, mit welchem der Körper auf Außeneinflüsse, beispielsweise veränderte Nährstoffversorgung, reagiert. Durch den gezielten Einbau von Propionyl oder Butyryl anstatt Acetyl wird der Histon-Code bestimmter Gene variiert, Bromodomänen können weniger gut an diese Modifikationen binden und die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an diese Gene wird reduziert. Hier könnten auch andere, bislang unbekannte Proteindomänen involviert sein, die Butyryllysine wesentlich effektiver binden als BDs. In diesem Fall wäre der Einbau von Propionyl und Butyryl ein gezielter Mechanismus, der die Expression bestimmter Gene definiert unterdrückt. Eine solche Regulation könnte durch zukünftige Identifizierung von HATs unterstrichen werden, die Propionyl- und Butyryl-CoA als Substrat gegenüber Acetyl-CoA bevorzugen. In diesem Fall könnten Acetyl- (C2), Propionyl- (C3), Butyryllysine (C4) als lineare Ergänzung zueinander angesehen werden, ähnlich der Mono-, Di-, Trimethylierung von Lysinen, und eine wichtige Erweiterung des Histon-Codes darstellen.

Andererseits ist jedoch auch der zufällige, nicht gerichtete Einbau von Propionyl und Butyryl denkbar, welcher allein vom Ausmaß des zur Verfügung stehenden CoA-Donorsubstrats abhängt. In diesem Fall könnten Schwankungen im Nährstoffhaushalt eines Organismus, die eine vermehrte β -Oxidation oder Fettsäuresynthese nach sich ziehen, zum erhöhten Einbau der kurzkettigen Acylmodifikationen in Histone führen. Diese Modifikationen beeinträchtigen jedoch durch verminderte Affinitäten die Interaktion mit Bromodomänen und damit beispielsweise Transkriptionsfaktoren. Aus diesem Grund werden beide Acyl-CoA-Varianten vom Körper über die Propionyl-CoA-Carboxylase oder die Butyryl-CoA-Dehydrogenase abgebaut und weiter metabolisiert, um deren Level gering zu halten. Zudem zeigte das Sir2-Homolog Hst2, das HDAC-Aktivität besitzt, eine höhere Affinität zu Propionyl- und Butyryllysine als zu Acetyllysine, wodurch diese Modifikationen effektiver entfernt werden können (Smith und Denu, 2007). In Anbetracht der Tatsache, dass bislang weder eine spezifische Transferase noch eine Erkennungsdomäne entdeckt wurde, deren Affinitäten für Propionyl- und Butyryl-CoA bzw. für die entsprechenden Lysinmodifikationen erhöht sind, ist der zufällige Einbau von Propionyl und Butyryl je nach Level der Acylmodifikation wahrscheinlicher. In diesem Fall könnte der Organismus auch den Einbau von metabolischen Zwischenprodukten zu einem gewissen Grad tolerieren, so dass durch die zufällige Verwendung von Propionyl- und Butyryl-CoA anstatt Acetyl-CoA die Bindung von Bromodomänen an Histone nicht oder zumindest nicht vollständig unterbunden wird. Die Propionylierung und Butyrylierung von Lysinen in Histonen würde somit keine Erweiterung, sondern eher einen Sonderfall des Histon-Codes darstellen.

Einflüsse eines zweifachen Acetyllysinmotivs auf die Bindung von BDs

Während BD1 an ein Histonfragment H4-K5(ac), das ein einzelnes Acetyllysin enthielt, mit einem K_d von etwa 325 μM band, wurde die Affinität der BD annähernd zehnfach erhöht, wenn ein Histonfragment mit zwei Acetyllysinen an K5 und K8 verwendet wurde (K_d : 38 μM). Diese von Morinière et al. zuerst gefundene Erhöhung für BrdT trat jedoch in einer ITC-Messung des zweifach acetylierten Peptids mit BD2 nicht auf (Morinière et al., 2009). Anhand der Kristallstruktur von BrdT BD1 im Vergleich zu den vorliegenden Strukturen von Brd4 BD1 und BD2 wurde klar, dass diese Selektivität von BD1 durch einen Wasser vermittelten Kontakt von D144 (Brd4-Nummerierung) zu dem doppelt acetylierten Peptid ermöglicht wird. In BD2 wird diese Position von H438 eingenommen, welches keine Wasserstoffbrücke ausbildet und den Kontakt sterisch verhindert. Dieses Phänomen könnte auch auf andere BET-Familien-Proteine übertragbar sein (Morinière et al., 2009). Durch die Kristallstruktur von BD1 und BD2 von Brd4 sowie durch die in 4.2.7 dargestellten Bindungsdaten konnte dies auch für Brd4 experimentell bestätigt werden. Der in Abbildung 58 aufgeführte Sequenzvergleich zeigt zudem, dass D144 in BD1 und H438 in BD2 in den bekannten BET-Familien-Proteine Brd2, Brd3, Brd4 und BrdT zu 100% konserviert sind und die Spezifität von BD1 zu dem doppelt acetylierten Peptid auf alle BET-Familie-Proteine übertragbar ist.

Die Bindung von doppelt acetylierten Peptiden durch Brd4 wurde bereits für das Volllängenprotein gezeigt, war jedoch auf das Vorhandensein zweier BDs zurückgeführt worden (Dey et al., 2003). Möglicherweise liegt in der dort beschriebenen Interaktion von Brd4 mit H4-K5(ac)K12(ac) sowie H3-K9(ac)K14(ac) jedoch eine alleinige Interaktion von BD1 mit den doppelten Acetyllysinmotiven vor, wenngleich dies aufgrund der Entfernung der Acetyllysine voneinander unwahrscheinlich erscheint. Für die Tandembromodomänen von TAF_{II}250 wurde eine bevorzugte Bindung von doppelt-acetylierten H4-Peptiden mit K_d 's von 1-6 μM gemessen (Jacobson et al., 2000). Auch in diesem Fall ist jedoch aufgrund der zwei vorhandenen Bromodomänen von TAF_{II}250 zu vermuten, dass eine simultane Bindung beider BDs zu einer Erhöhung der Affinität führt. Zukünftige Arbeiten zur Analyse des Effekts von zwei-, drei- oder mehrfach acetylierten Histonfragmenten auf die Bindung von BDs sollten im Kontext eines Brd4-Konstruktes erfolgen, welches beide BDs enthält. Ein solches Konstrukt Brd4 (51-464), welches der physiologisch relevanten Form von Brd4 näher kommt, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt worden (Daten nicht gezeigt), konnte jedoch aufgrund starker Proteinverunreinigungen und Degradation nicht verwendet werden, wie ebenfalls von Liu et al. berichtet (Liu et al., 2008). Eine Betrachtung der Interaktion von BDs mit Acetyllysinen in vollständigen Histonen könnte ebenfalls einen tieferen Einblick in die Regulation dieser Wechselwirkungen liefern, da bisher stets isolierte Histonfragmente von ≤ 20 Aminosäuren verwendet wurden. Dies würde potentielle Beeinträchtigungen durch die gewählte Länge der acetylierten Peptide ausschließen. So ist in der vorliegenden Arbeit nicht auszuschließen, dass durch den Einsatz von oktameren (H4-K5(ac)) und dodecameren Peptiden (H4-K5(ac)K8(ac)) eine Vergleichbarkeit aufgrund nicht identifizierter Nebeneffekte nur eingeschränkt möglich ist.

Durch den Nachweis einer erhöhten Affinität von BD1 an ein doppelt acetyliertes Histonmotiv ergibt sich ein detailliertes Bild der Interaktion von Brd4 mit Histonen, nach dem

Brd4 mit mindestens drei Acetyllysinen gleichzeitig interagieren könnte. Dabei ist nicht auszuschließen, dass diese Acetyllysine sowohl auf H3 als auch H4 liegen, da aufgrund der möglichen räumlichen Trennung der BDs von Brd4 durch mehr als 200 Reste und keiner bekannten Dimerisierung der Domänen eine Bindung auf unterschiedliche Histone möglich erscheint. Die Laufrichtungen der Peptidkette in den vorgelegten Kristallstrukturen sind zudem teils gegenläufig und deuten nicht auf eine bevorzugte Laufrichtung der Histonmotive hin. Vermutlich spielt somit weniger die Laufrichtung der Peptidkette als vielmehr die Position von zusätzlich stabilisierenden Resten eine Rolle, wie es beispielsweise in der Struktur von BD1:H3-K23(prop) durch das mit der BC-Schleife interagierende K27 erfolgt (Abbildung 54).

Die Bedeutung der Interaktion von Brd4 mit multiplen Acetylierungsmustern auf den Histonen wird unterstrichen von der Interaktion von Brd4 mit dreifach acetyliertem H4 (H4-K5(ac)K8(ac)K12(ac)), wodurch eine Rekrutierung von P-TEFb an PRG-Promotoren (*engl.: primary response genes*) vermittelt wird (Hargreaves et al., 2009). In Anbetracht der unter 4.2.7 beschriebenen Bindungsdaten könnte diese Rekrutierung durch Bindung von Brd4 BD1 an das doppelt acetylierte H4-K5(ac)K8(ac) und von BD2 an H4-K12(ac) mit hoher Affinität und Spezifität erfolgen. Durch die Bindung an dieses dreifache Acetylierungsmotiv wäre Brd4 in der Lage, P-TEFb an PRG-Promotoren zu rekrutieren, die eine schnelle Reaktion der Zelle auf Umwelteinflüsse durch Expression von PRG-Genen ermöglicht (Hargreaves et al., 2009). Die Acetylierung der entsprechenden Lysine in Histonen ist dabei abhängig von der Rekrutierung von HATs wie p300 und MOF, wobei die Bindung von MOF seinerseits die Phosphorylierung von H3-S10 durch PIM1 voraussetzt (Byun et al., 2009; Zippo et al., 2009). Dieses Beispiel verdeutlicht die Komplexität des Zusammenspiels unterschiedlicher Histonmodifikationen, die zukünftige Studien zur Entschlüsselung des Histon-Codes unerlässlich für ein detailliertes Verständnis der Transkriptionsregulation machen.

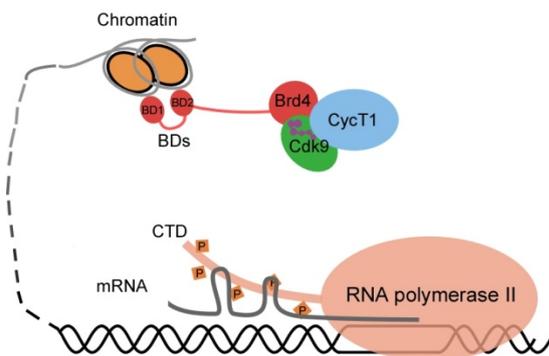
Interaktion von BDs mit acetyliertem CycT1 als neuer Regulationsmechanismus von P-TEFb

Die vor kurzem gemachte Entdeckung der Acetylierung von CycT1 an vier zentralen Lysinen stellte einen interessanten, neuen Ansatz zur Regulation des P-TEFb-Komplexes dar (Cho et al., 2009). Ursprünglich war eine Interaktion von Brd4 über seine BDs mit einem zentralen Bereich von CycT1 beschrieben worden, welcher die Interaktion mit P-TEFb vermitteln sollte (Jang et al., 2005). Diese Beobachtung war aufgrund widersprechender Ergebnisse zur Bindung von Brd4 über CT an P-TEFb in den Hintergrund gerückt, wenngleich auch hier eine Interaktion von CT mit CycT1 erwähnt wurde (Bisgrove et al., 2007). Zwar konnte diese Interaktion mit CycT1 über CT in der vorliegenden Arbeit mit rekombinanten Proteinen nicht bestätigt werden, es wurde jedoch eine Bindung von BD2 an zwei acetylierte CycT1-Fragmente (CycT1-K390(ac) und CycT1-K404(ac)) nachgewiesen. Diese Bindung war mit K_d 's von 110 μ M und 319 μ M ähnlich stark (bzw. schwach) wie die zu acetylierten Histonfragmenten. Unglücklicherweise konnte eine Bindung dieser Peptide an BD1 aufgrund der Präzipitation des Proteins während der Messung nicht geklärt werden. Auch die Komplexbildung aus BD1 und den CycT1-Peptiden im Kristall gelang nicht. Möglicherweise verhindern die negativ-geladenen Glutamate der Peptide (Sequenzen siehe

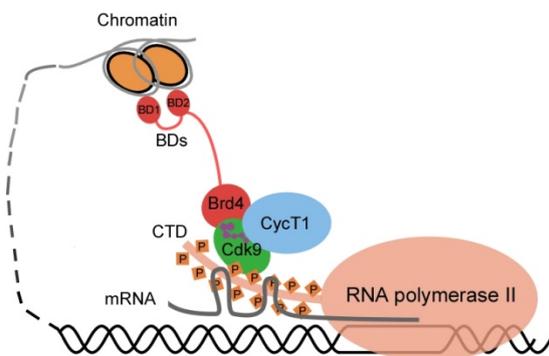
3.4) an Position +1 und +4 C-terminal zum Acetyllysine eine geordnete Interaktion im Kristall mit BD1, da die elektrostatische Oberfläche der BDs im Bereich der Bindungstasche von negativen Ladungen dominiert wird, welche die ebenfalls negative Ladung der Peptide repulsieren könnte. Dies wäre im Einklang mit der Beobachtung, dass weniger die Ligandensequenz, als vielmehr die Ladung entscheidend für die Bindung eines Motivs an BDs ist. Dabei wird die Bindung durch positive Ladungen begünstigt (Hudson et al., 2000), und entsprechend wirken negative Ladungen destabilisierend.

Mit dem Nachweis einer Bindung von Brd4 BD2 an CycT1 über acetylierten Lysine eröffnen sich neue Hypothesen der Transkriptionsregulation durch P-TEFb (Abbildung 72): Noch vor der Rekrutierung von P-TEFb zur CTD von Pol II bindet Brd4 über seine beiden Bromodomänen an acetylierte Lysine in Chromatinstrukturen nahe des zu transkribierenden

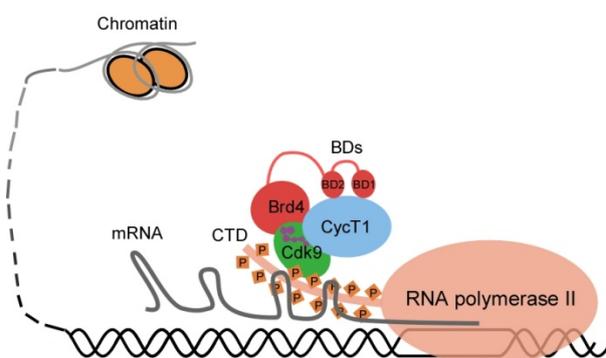
A



B



C



Gens. RNA Pol II befindet sich zu diesem Zeitpunkt im Transkriptionsarrest. Durch Bindung des C-Terminus CT von Brd4 an Cdk9 wird der P-TEFb-Komplex rekrutiert und interagiert mit der CTD, welche ihrerseits von P-TEFb phosphoryliert wird. Durch dieses Signal in Kombination mit der Phosphorylierung von NELF und DSIF (hier nicht dargestellt) wird der Transkriptionsarrest aufgehoben und die Transkriptionselongation eingeleitet. Die Bromodomänen von Brd4 lösen sich von den Histonen und binden nun an die acetylierten Lysine im zentralen Bereich von CycT1. Der Transkriptionskomplex kann sich nun von den initial gebundenen Histonen und dem Promotor entfernen und die Transkription des Gens bis zum Ende durchführen.

Abbildung 72: Mögliche Rekrutierung von P-TEFb durch Brd4. A) Durch seine Bromodomänen BDs interagiert Brd4 mit acetylierten Histonen nahe dem Transkriptionsursprung. B) Durch Bindung von Brd4 CT an Cdk9 wird P-TEFb an die CTD rekrutiert und kann diese phosphorylieren. C) Nach der Rekrutierung binden die BDs an acetylierte Lysine in CycT1, und die Transkriptionselongation kann fortfahren.

Bislang ist nicht bekannt, ob die dargestellte Interaktion von BDs aus Brd4 mit CycT1 tatsächlich physiologisch relevant ist oder nur ein Artefakt aus der Verwendung einer isolierten Proteindomäne und eines Peptids darstellt. Hierfür werden Interaktionsexperimente

mit größeren Bereichen von Brd4 (wie BD1 und BD2 in einem Konstrukt) oder CycT1 *in vivo* und *in vitro* nötig sein. Da in der ursprünglichen Beschreibung der Bindung von Brd4 und CycT1 rekombinante Proteine aus einer *E. coli*-Expression verwendet wurden (Jang et al., 2005), ist eine Acetylierung von CycT1 in den dort verwendeten Konstrukte unwahrscheinlich. Es wird in zukünftigen Experimenten zu untersuchen sein, ob tatsächlich CT nur für diese Interaktion verantwortlich war (Bisgrove et al., 2007) oder ob noch weitere Wechselwirkungen zwischen CycT1 und Brd4 vorliegen, die für die Regulation von P-TEFb entscheidend sind.

5.3 Larp7 als stabilisierender Faktor des 7SK snRNP

Die 332 nt große 7SK snRNA ist als Gerüst des snRNPs essentiell für die Stabilität des inhibierten P-TEFb-Komplexes und wird ihrerseits durch das Protein Larp7 stabilisiert (Krueger et al., 2008; He et al., 2008; Markert et al., 2008). Die biochemische Charakterisierung von Larp7 in der vorliegenden Arbeit lieferte erste Einblicke in die Domänenorganisation des Proteins und seine Interaktion mit der 7SK snRNA.

Nukleinsäurefreie Darstellung von Larp7

Larp7 als RNA-bindendes Protein enthält überdurchschnittlich viele Aminosäuren mit positiven Ladungen. Dementsprechend traten bei den Proteinreinigungen der drei verwendeten Larp7-Konstrukte anfänglich starke Verunreinigungen mit unbekanntem Nukleinsäuren auf. Diese Artefakte der rekombinanten Reinigung des Proteins aus *E. coli* stellten ein großes Problem dar, da sie Interaktionsstudien mit dem natürlichen Bindungspartner 7SK beeinflussen könnten. Für biochemische und strukturelle Studien des Larp7-verwandten La-Proteins wurden zur homogenen, nukleinsäurefreien Darstellung aus diesen Gründen zwei bis drei chromatographische Verfahren eingesetzt (Stefano, 1984; Jacks et al., 2003; Teplova et al., 2006). Doch auch die Analyse der Interaktion von Larp7 mit anderen Proteinen könnte durch eine massive unspezifische Bindung von Nukleinsäuren beeinträchtigt werden. So wurde beispielsweise eine Interaktion von Larp7 mit der 7SK snRNP-Komponente Hexim1 durch Präzipitationsexperimente beschrieben (Markert et al., 2008). Beim Versuch der Reproduktion dieses Experimentes mit den initialen Konstrukten konnte ebenfalls eine leichte Interaktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), die jedoch durch Verwendung der aufwendiger gereinigten Proteine nicht mehr auftrat. Daher ist zu vermuten, dass die ursprünglich beschriebene Interaktion – zumindest teilweise – auf Interaktion beider Proteine mit unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren zurückzuführen ist (Markert et al., 2008). Solche verfälschten Interaktionsergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit durch die Optimierung der Larp7-Reinigungen zur Gewinnung nukleinsäurefreier Proteine ausgeschlossen. Die fehlende Interaktion von Larp7 und Hexim1 im Präzipitationsexperimente ist jedoch kein endgültiger Beweis, dass diese 7SK-bindenden Proteine tatsächlich nicht miteinander wechselwirken. In zukünftigen Experimenten sollte dieses mit sensitiveren Methoden überprüft werden.

Einblicke in die Stöchiometrie und Struktur von Larp7

Mit Hilfe der dargestellten Larp7-Konstrukte wurde mittels Größenausschlusschromatographie die deutlich verbesserte Homogenität der Proben durch Entfernung unspezifisch gebundener RNAs oder DNAs nachgewiesen, wodurch eine biochemische Charakterisierung der Proteine möglich war. Das N-terminale L7-3 (32-202)-Konstrukt mit der La- und RRM1-Domäne lag genau wie die N-terminalen Domänen des La-Proteins in monomerer Form vor (Craig et al., 1997). Die Region des La-Proteins, die für die Dimerisierung verantwortlich ist, liegt im C-terminalen Bereich hinter dem RRM3. Die Retentionszeiten der Larp7-Proteine L7-2 (24-555) und L7-4 (448-555) sind jedoch nicht eindeutig bezüglich einer Dimerisierung von Larp7. L7-2 mit allen drei Domänen eluiert deutlich früher als es sein Molekulargewicht von 61 kDa erwarten lässt und weist, verglichen mit dem Proteinstandard, eine apparente Masse von etwa 150 kDa auf. Dies entspricht der 2,5-fachen Masse des Proteins und könnte als Hinweis auf eine Dimerisierung des Proteins gewertet werden. Die zusätzliche Erhöhung über 120 kDa (L7-2-Dimer) hinaus könnte ebenso ein Anzeichen für ungefaltete Bereiche in L7-2 sein, welche den hydrodynamischen Radius des Proteins erhöhen. Die analytischen Gelfiltrationsdaten liefern somit möglicherweise einen ersten Hinweis auf eine Dimerisierung von Larp7. Das Retentionsverhalten des RRM3-Konstrukts L7-4 mit einer Elution bei apparenten 20 kDa (theoretische Masse: 12 kDa) ist nicht eindeutig und deutet weniger auf eine Dimerisierung, als mehr auf ebenfalls teilweise ungefaltete Bereiche des Proteins hin, die den hydrodynamischen Radius erhöhen. Dies würde eine Dimerisierung von Larp7 über die RRM3-Domäne selbst ausschließen. Das La-Protein dimerisiert über eine C-terminal des RRM3 liegende Region, während RRM3 selbst in monomerer Form vorliegt (Craig et al., 1997; Jacks et al., 2003). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte mit der RRM3 enden, ist es möglich, dass Larp7 eine bisher nicht identifizierte Dimerisierungsdomäne besitzt, die sich N-terminal des RRM3 befindet. Sequenzvergleiche zeigten jedoch keine offensichtliche Konservierung in diesem Bereich (Daten nicht gezeigt). Andererseits wurde bei der Untersuchung der Interaktion von Larp7 und 7SK eine zusätzliche EMSA-Bande des Larp7:7SK-Komplexes beobachtet, welche durch Zugabe höherer Mengen Larp7 zu 7SK erreicht wurde (Krueger et al., 2008). Diese Bande wurde als 2:1-Komplex aus zwei RNAs mit Larp7 oder als Larp7-Dimer gedeutet, welches eine 7SK snRNA bindet. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtung blieb unklar. Da jedoch auch für andere Bestandteile des inhibierten 7SK snRNPs die Formung eines Dimers diskutiert wurde, könnte eine Dimerisierung von Larp7 die Interaktion mit P-TEFb und den anderen Bestandteilen des snRNPs begünstigen. Beispielsweise bildet Hexim1 über seine C-terminale TBD ein homodimeres Coiled-Coil aus (Dames et al., 2005). Sollte die Interaktion von Larp7 und Hexim1, die von Markert et al. beschrieben wurde, nicht nur auf unspezifisch gebundene Nukleinsäuren zurückzuführen sein, sondern tatsächlich im snRNP relevant sein, würde eine gleichzeitige Dimerisierung von Larp7 und Hexim1 eine zusätzliche Stabilisierung der Interaktion und dadurch des snRNPs bewirken.

Die Bestimmung der Sekundärstrukturelemente von Larp7-Konstrukten über CD-Spektroskopie zeigte eine größtenteils α -helikale Faltung der N-terminalen La- und RRM1-Domäne, die somit große Ähnlichkeiten zu den homologen Domänen in La aufweist.

Die La-Domäne bildet eine *winged-helix-turn-helix*-Struktur aus 6 Helices und 6 Faltblättern aus, während die RRM1-Domäne der klassischen RRM-Faltung aus vier zentralen β -Faltblättern folgt, die von drei α -Helices umgeben sind (Dong et al., 2004; Alfano et al., 2004). Da auch Larp7 über eine 40%ige helikale Faltung verfügt, scheinen die Strukturen von La und Larp7 in den N-terminalen Domänen ähnlich zu sein, wenngleich Larp7 nur einen geringen β -Faltblattanteil zeigte. Dagegen zeigte das C-terminale L7-4-Konstrukt der RRM3 einen geringeren Anteil von Helices zugunsten von mehr β -Faltblättern auf, wie es auch in CD-spektroskopischen Analysen und der NMR-Struktur der RRM3 von La gefunden wurde (Jacks et al., 2003). Somit kann bis zur Klärung der Kristall- oder NMR-Struktur von Larp7-Domänen von einer Faltung ähnlich der in La ausgegangen werden. Gerade für die Bestimmung der Strukturen der isolierten N- oder C-terminalen Domänen stellen die hier dargestellten Konstrukte L7-3 (32-202) und L7-4 (448-555) eine gute Basis dar, wenngleich trotz initialer Kristallisationsversuche bislang keine Kristalle der Domänen von Larp7 gewonnen werden konnten.

Interaktion von Larp7 mit der 7SK snRNA

In der vorgestellten Arbeit wurde durch den EMSA-Bindungsassay mit nicht-radioaktiv-markierter 7SK snRNA, deren unspezifische Interaktionen mit Larp7 durch Anwesenheit von Heparin unterdrückt werden konnte, ein wichtiges Werkzeug zur Analyse der Interaktion von Larp7 und der 7SK snRNA etabliert. In diesen EMSAs wurde gezeigt, dass nicht nur das L7-2 (24-555)-Konstrukt mit allen drei Domänen, sondern auch die N-terminalen La- und RRM1-Domänen an 7SK binden. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die ebenfalls feststellten, dass das C-terminale RRM3 nicht an 7SK bindet (He et al., 2008; Markert et al., 2008). Die beobachtete leichte Interaktion von 7SK und RRM3 ist vermutlich auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen, da sie durch Heparin vollständig unterdrückt werden konnten. Auch in La wird die Bindung zu Pol III-Transkripten durch beide N-terminalen Domänen La und RRM1 vermittelt, die direkt mit dem 3'-Ende der RNA interagieren, während RRM3 nur eine untergeordnete Rolle in der RNA-Bindung spielt (Ohndorf et al., 2001; Kotik-Kogan et al., 2008). Jedoch ist auch in La die Funktion der RRM3 bislang nicht endgültig geklärt. Interessanterweise wurden in Magenkrebszellen C-terminale Mutationen von Larp7 gefunden, für die He et al. zeigen konnten, dass sie Interaktionen von Larp7 mit dem inhibierten P-TEFb-Komplex (7SK snRNP) beeinträchtigten (Mori et al., 2002; He et al., 2008). Dies könnte auf eine Rolle des C-Terminus und RRM3 in der Stabilisierung des snRNP durch direkte Interaktion mit anderen Proteinen des Komplexes deuten.

Bei Verwendung einer 7SK-Variante, deren 3' UUU_{OH}-Nukleotide zu UAG_{OH} verändert waren, wurde trotzdem eine Interaktion mit L7-2 beobachtet, die jedoch abgeschwächt war. He et al. konnte zudem zeigen, dass bei Deletion der vier 3'-Nukleotiden von 7SK eine Bindung an 7SK fast vollständig unterbunden wird (He et al., 2008). Dies macht deutlich, dass - wie auch in La - diese 3'-Reste hauptsächlich für die Bindung von La- und RRM1-Domäne entscheidend sind, während andere Interaktionen nur untergeordnete Rollen spielen (Ohndorf et al., 2001). Die Bindung der 3'-Reste von 7SK durch Larp7 stellt analog zu La vermutlich einen Schutz der RNA vor dem Abbau durch Exonukleasen dar (Wolin und

Cedervall, 2002; He et al., 2008). In strukturellen Studien zur Bindung von einzeln- und doppelsträngigen RNAs variabler 3'-Sequenzen wurde deutlich, dass die letzten beiden Nukleotide einer Pol III-RNA (U_1 und U_2) die entscheidenden Kontakte zu La ausbilden, während U_3 und nachfolgende Reste unspezifisch gebunden werden (Teplova et al., 2006; Kotik-Kogan et al., 2008). Vor allem U_2 wird basenspezifisch von La- und RRM1-Domäne gebunden, und eine Mutationen dieses Restes schwächt die Interaktion um den Faktor 10 ab (Ohndorf et al., 2001; Teplova et al., 2006). Auch in 7SK wurde die Interaktion durch Mutation dieser entscheidenden Reste U_2 (A) und U_1 (G) deutlich geschwächt, jedoch kann Larp7 die RNA trotzdem binden und vor dem Abbau schützen. Dies legt auch die Erkennung zusätzlicher, bislang nicht identifizierter Regionen der 7SK durch Larp7 nahe, deren Eingrenzung zum Verständnis der Funktion von Larp7 essentiell beitragen wird.

Mit der Erstellung des kurzen 39-nt-Fragment von 7SK, welches ebenso wie die vollständige RNA mit den Larp7-Konstrukten interagiert, wurde zusammen mit den Konstrukten L7-3 und L7-4 passende Fragmente erstellt, um in zukünftigen strukturellen Studien das detaillierte Zusammenspiel von Larp7 und der 7SK snRNA zu untersuchen. Da L7-2 und das 39-nt-Konstrukt auch während einer Gelfiltration stabil gebunden bleiben, könnte ein so gereinigter Komplex für initiale Kristallisationsansätze eingesetzt werden, um Einblick in die Bindung aller drei Larp7-Domänen La, RRM1 und RRM3 an 7SK zu gewinnen. Somit liefert die vorliegende Arbeit zur Interaktion von Larp7 und der 7SK snRNA eine gute Ausgangslage zur genaueren Charakterisierung des RNA:Protein-Komplexes auf biochemischer und struktureller Basis.

6 Anhang

Tabelle 4: Vektoren und Massen der verwendeten Proteinkonstrukte. Die aufgelisteten Proteine wurden in die angegebenen Vektoren kloniert und nach der Expression gereinigt. Die Massen der Proteine wurden per ESI-MS ermittelt. Theoretische Massen wurden über die Internetseite <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html> berechnet.

Proteinkonstrukt	Verwendeter Vektor	Theoretische Masse	Tatsächliche Masse
Larp7-2 (24-555)	pOPINM	61.088 Da	61.166 Da
Larp7-3 (32-202)	pOPINM	19.673 Da	19.751 Da
Larp7-4 (448-555)	pOPINM	12.442 Da	12.443 Da
BDI (54-168)	pProExHTb	14.238 Da	14.238 Da
BDI (42-168)	pProExHTb	15.369 Da	15.369 Da
BDII (350-464)	pProExHTb	13.875 Da	13.876 Da
BDII A456Q	pProExHTb	13.932 Da	13.935 Da
BDII R445A/D449A	pProExHTb	13.746 Da	13.748 Da
CT (1351-1400)	pGEX4T1 tev	6.360 Da	6.360 Da
CT-W (W1338-1400)	pGEX4T1 tev	7.655 Da	7.655 Da
CT LLAA	pGEX4T1 tev	7.570 Da	7.570 Da
CT R4A	pGEX4T1 tev	7.314 Da	7.314 Da
CT RKRA	pGEX4T1 tev	7.427 Da	7.428 Da
CT RxLA	pGEX4T1 tev	7.527 Da	7.528 Da
CycT1 (1-272)	pGEX4T1 tev	32.123 Da	32.127 Da
Hxm1fl	pGEX4T1 tev	40.752 Da	40.747 Da
Hxm1 TBD		(Schulte et al., 2005)	
Hxm1 200		(Czudnochowski, 2009)	
P-TEFb (Cdk9 1-340), CycT1 1-272-His)	pFastBac Dual (Czudnochowski, 2009)	32.291 Da 39091 Da	32.307 Da 39.076 Da
GST-CTD 9x	pGEX6PN	33.415 Da	33.416 Da

ITC-Messungen der vorliegenden Arbeit

Tabelle 5: Auflistung aller Messparameter der durchgeführten ITC-Messungen

Spritze	mM	Zelle	mM	K_d	ΔH	$T\Delta S$	ΔG	Molares Verhältnis n
				μM	kcal/mol	kcal/mol	kcal/mol	
CT	0,08	P-TEFb	0,008	$1,21 \pm 0,6$	$-19,8 \pm 0,39$	-12,40	-7,4	$0,55 \pm 0,08$
BD1	5,9	H3-K14(ac)	0,59	118 ± 28	$-0,59 \pm 0,02$	4,77	-5,36	$1,33 \pm 0,06$
BD1	5,4	H4-K5(ac)	0,54	325 ± 72	$-1,99 \pm 0,07$	2,35	-4,34	$2,35 \pm 0,20$
BD1	5,9	H4-K16(ac)	0,59	308 ± 142	$-0,76 \pm 0,06$	1,47	-2,23	$1,47 \pm 0,21$
BD2	6,0	H3-K14(ac)	0,60	327 ± 75	$-1,68 \pm 0,06$	3,07	-4,75	$2,31 \pm 0,19$
BD2	6,0	H4-K5(ac)	0,73	107 ± 23	$-1,81 \pm 0,06$	3,61	-5,42	$1,91 \pm 0,08$
BD2	6,0	H4-K16(ac)	0,60	133 ± 25	$-0,63 \pm 0,02$	4,64	-5,27	$1,43 \pm 0,06$
BD2	6,0	T1-K390(ac)	0,60	110 ± 21	$-2,35 \pm 0,07$	3,04	-5,39	$1,44 \pm 0,07$
BD2	6,0	T1-K404(ac)	0,60	319 ± 93	$-1,69 \pm 0,08$	3,07	-4,76	$1,84 \pm 0,18$
BD1	5,0	H3-K14(prop)	0,50	$337 \pm 76,2$	$-0,64 \pm 0,10$	4,08	-4,72	$0,92 \pm 0,09$
BD1	5,0	H3-K23(prop)	0,50	$380 \pm 104,5$	$-0,64 \pm 0,01$	4,02	-4,66	$1,06 \pm 0,12$
BD1	5,0	H3-K14(but)	0,50	-	-	-	-	-
H3-K14(prop)	5,0	BD2	0,50	213 ± 14	$-1,48 \pm 0,05$	3,52	-5,00	$1,00 \pm 0,02$
H3-K23(prop)	5,0	BD2	0,50	$208 \pm 16,0$	$-0,86 \pm 0,03$	4,17	-5,03	$0,96 \pm 0,02$
H3-K14(but)	5,0	BD2	0,50	-	-	-	-	-
BD1	3,45	H4K5(ac)K8(ac)	0,50	$38 \pm 3,7$	$-10,04 \pm 0,17$	-3,99	-6,05	$0,90 \pm 0,01$
H4-K5(ac)K8(ac)	5,0	BD2	0,50	212 ± 35	$-6,35 \pm 0,50$	-1,34	-5,01	$1,21 \pm 0,05$

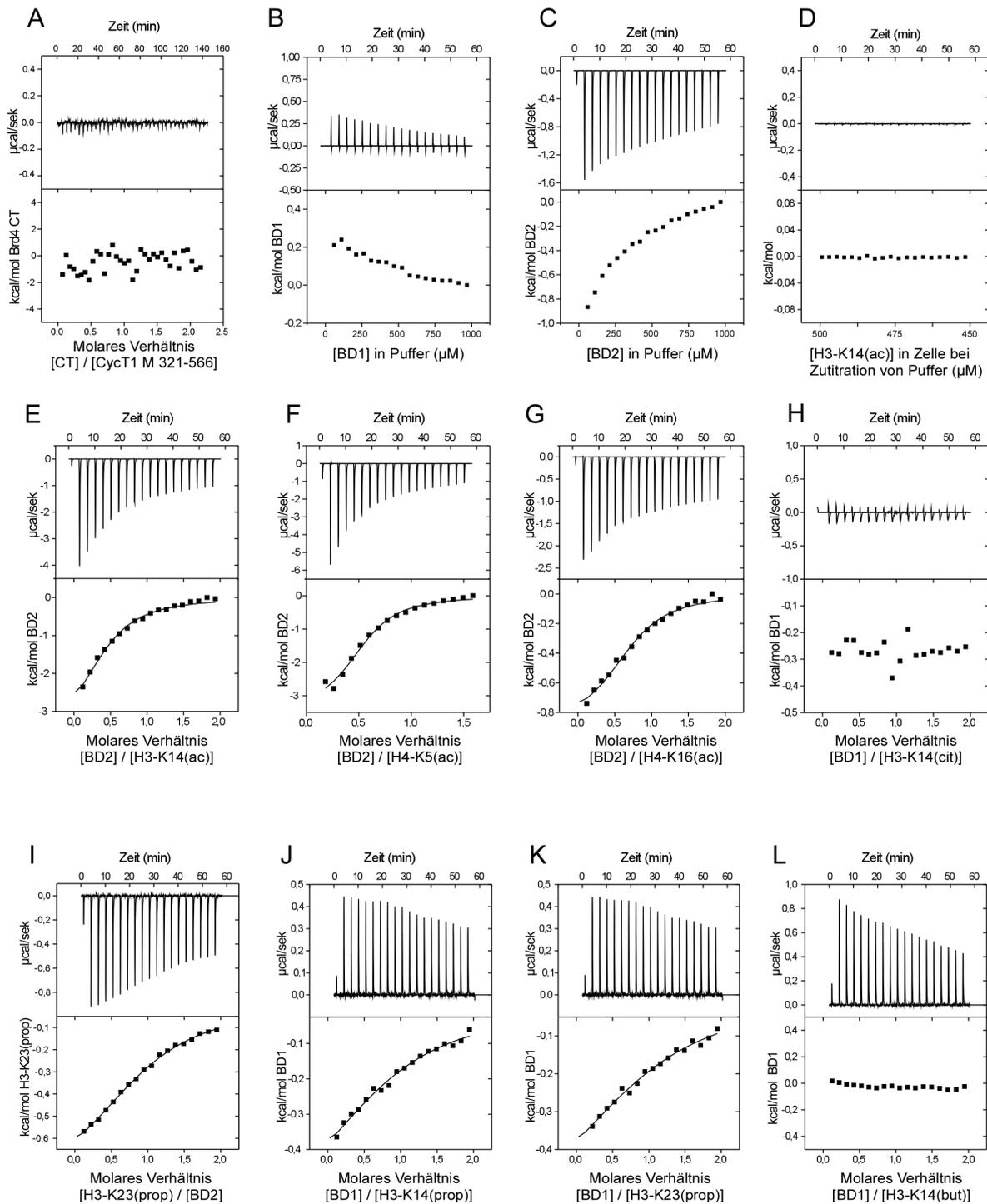


Abbildung 73: Zusätzliche ITC-Titrations und Kontrollmessungen.

A) 180 μM Brd4 CT gegen 18 μM Cyt1 M (321-566). B) 5,9 mM BD1 gegen Puffer. C) 6 mM BD2 gegen Puffer. D) Puffer gegen 590 μM Peptid H3-K14(ac). E) 6 mM BD2 gegen 600 μM H3-K14(ac). F) 6 mM BD2 gegen 730 μM H4-K5(ac). G) 6 mM BD2 gegen 600 μM H4-K16(ac). H) 5,9 mM BD1 gegen 590 μM H3-K14(cit). I) 5 mM H3-K23(prop) gegen 500 μM BD2. J) 5 mM BD1 gegen 500 μM H3-K14(prop). K) 5 mM BD1 gegen 500 μM H3-K23(prop). L) 5 mM BD1 gegen 500 μM H3-K14(but).

Kristallisationsparameter

Tabelle 6: Vollständige Parameter der Strukturlösung der BD1- und BD2-Strukturen

	Brd4 BD1	Brd4 BD1 mit H3-K14(ac)	Brd4 BD2	Brd4 BD2 mit H3-K14(ac)	Brd4 BD1 mit H3-K23(prop)	Brd4 BD1 mit H3-K14(but)
Datenaufnahme						
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA
Wellenlänge [Å]	1,00	1,00	0,97642	0,97886	1,00	0,978946
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle a, b, c [Å] α, β, γ [°]	a=34,01, b=47,44, c=78,02 α=β=γ=90°	a=36,13, b=47,03, c=77,25 α=β=γ=90°	a=52,06, b=73,05, c=32,30 α=β=γ=90°	a=52,10, b=73,15, c=32,16 α=β=γ=90°	a=36,21, b=47,00, c=78,10 α=β=γ=90°	a=34,00, b=47,23, c=77,98 α=β=γ=90°
Auflösung [Å]*	19,6 – 1,55 (1,6-1,55)	19,7 – 1,8 (1,9-1,8)	19,5 – 1,2 (1,25-1,2)	19,5 – 1,20 (1,25-1,2)	19,60 – 1,75 (1,8-1,75)	19,60 – 1,65 (1,7-1,65)
Gemessene Reflektionen*	146 605 (13 213)	97 615 (14 698)	195 195 (20 535)	365 947 (40 606)	53 560 (4 276)	61 824 (5 218)
Einzigartige Reflektionen*	18 865 (1 668)	12 652 (1857)	39 272 (4460)	37 336 (4 265)	13 605 (1072)	15 640 (1 309)
R _{merge} [%]*	8,2 (43,6)	6,8 (42,9)	8,0 (41,5)	5,2 (23,1)	8,6 (53,2)	8,0 (50,2)
Multiplizität*	7,7 (7,9)	7,7 (7,9)	5,0 (4,6)	9,8 (9,5)	3,9 (4,0)	4,0 (4,0)
<I/σ>*	15,4 (5,1)	16,5 (4,7)	20,4 (4,0)	23,4 (6,9)	20,1 (4,2)	20,8 (4,1)
Vollständigkeit [%]*	99,4 (99,5)	99,4 (99,9)	99,9 (100,0)	95,2 (96,3)	99,7 (100,0)	99,5 (98,8)
Modellverfeinerung/Refinement						
Gesamtzahl der Atome	1177	1200	1231	1194	1230	1202
Inhalt des Modells	mol A: MG-S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 Glycerin 1 EG 111 Wasser	mol A: MG-S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 H3 Peptid (GG Ack A) 1 EG 104 Wasser	mol A: GAMG-S ₃₄₉ -D ₄₆₀ 3 EG 2 β-ME 219 Wasser	mol A: GAMG-S ₃₄₉ -D ₄₆₀ 2 EG 2 β-ME 223 Wasser	mol A: MG-S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 H3 Peptid (AT K(prop) AARK) 1 EG 151 Wasser	mol A: MG-S ₄₂ -T ₁₆₆ 1 H3 Peptid (G K(but)) 1 EG 135 Wasser
Anzahl der Wassermoleküle	111	104	219	223	151	135
Lösungsmittelanteil (%)	40	42	30	33	42	40
R _{factor} (%)*	18,4 (23,9)	19,6 (29,1)	11,6 (15,3)	11,6 (13,3)	17,2 (23,3)	17,7 (23,3)
R _{free} (%)*	22,0 (25,2)	25,9 (30,8)	14,5 (20,9)	15,0 (14,4)	21,9 (25,4)	22,5 (27,6)
rms der Bindungen [Å]	0,026	0,021	0,030	0,034	0,023	0,028
rms der Winkel [Å]	2,238	1,957	2,525	2,359	1,936	1,195
 Gesamtz [Å ²]	24,6	41,1	15,5	15,8	27,9	19,9
 BD [Å ²]	23,4	38,7	12,4	12,5	25,9	18,1
 Wasser [Å ²]	35,6	47,3	30,0	29,8	37,7	29,5
Ramachandran plot	begünstigte : 91,8% erlaubt : 8,2%	begünstigte: 88,4% erlaubt : 10,7% (zusätzlich) 0,9% (generell)	begünstigte: 93,3% erlaubt : 5,8% unerlaubt: 1%	begünstigte: 94,2% erlaubt : 5,8%	most favored : 96,1% allowed : 3,9%	most favored : 96,8% allowed : 3,2%

* Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale

$R_{\text{merge}} = \frac{\sum (|I - \langle I \rangle|)}{\sum I}$, wobei I und $\langle I \rangle$ die gemessenen und gemittelten Intensitäten aller Reflektionen mit ihren Symmetrieäquivalenten darstellt.

$R_{\text{factor}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, wobei F_{obs} und F_{calc} die beobachteten und berechneten Strukturformfaktoren der Reflektion hkl darstellt.

R_{free} wurde auf Grundlage von zufällig gewählten Reflektionen (5%) errechnet, die vom der Verfeinerung ausgeschlossen wurde.

7 Literaturverzeichnis

- Abbate, E.A., Voitenleitner, C., and Botchan, M.R. (2006). Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* 24, 877-889.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2003). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, Vol 4. Auflage (Wiley-VCH).
- Alfano, C., Sanfelice, D., Babon, J., Kelly, G., Jacks, A., Curry, S., and Conte, M.R. (2004). Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nat Struct Mol Biol* 11, 323-329.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
- Anand, K., Schulte, A., Fujinaga, K., Scheffzek, K., and Geyer, M. (2007). Cyclin box structure of the P-TEFb subunit cyclin T1 derived from a fusion complex with EIAV tat. *J Mol Biol* 370, 826-836.
- Anand, K., Schulte, A., Vogel-Bachmayr, K., Scheffzek, K., and Geyer, M. (2008). Structural insights into the cyclin T1-Tat-TAR RNA transcription activation complex from EIAV. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1287-1292.
- Armache, K.J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6964-6968.
- Armache, K.J., Mitterweger, S., Meinhart, A., and Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem* 280, 7131-7134.
- Asturias, F.J., Jiang, Y.W., Myers, L.C., Gustafsson, C.M., and Kornberg, R.D. (1999). Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* 283, 985-987.
- Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* 79, 137-158.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10037-10041.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature* 436, 1103-1106.
- Barboric, M., Kohoutek, J., Price, J.P., Blazek, D., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (2005). Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *EMBO J* 24, 4291-4303.
- Barboric, M., Yik, J.H., Czudnochowski, N., Yang, Z., Chen, R., Contreras, X., Geyer, M., Matija Peterlin, B., and Zhou, Q. (2007). Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res* 35, 2003-2012.
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E.D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A.N., Debreczeni, J.E., Knapp, S., and Johnson, L.N. (2008). The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO J* 27, 1907-1918.
- Bayfield, M.A., Yang, R., and Marais, R.J. (2010). Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta*.
- Bhaumik, S.R., Smith, E., and Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1008-1016.
- Bienkiewicz, E.A., Moon Woody, A., and Woody, R.W. (2000). Conformation of the RNA polymerase II C-terminal domain: circular dichroism of long and short fragments. *J Mol Biol* 297, 119-133.
- Biewenga, P., Buist, M.R., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., van Kampen, A.H., ten Kate, F.J., and Baas, F. (2008). Gene expression in early stage cervical cancer. *Gynecol Oncol* 108, 520-526.

- Bisgrove, D.A., Mahmoudi, T., Henklein, P., and Verdin, E. (2007). Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13690-13695.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.
- Brown, D.T. (2003). Histone H1 and the dynamic regulation of chromatin function. *Biochem Cell Biol* *81*, 221-227.
- Brown, N.R., Noble, M.E., Lawrie, A.M., Morris, M.C., Tunnah, P., Divita, G., Johnson, L.N., and Endicott, J.A. (1999). Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem* *274*, 8746-8756.
- Brunger, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* *355*, 472-475.
- Bushnell, D.A., Westover, K.D., Davis, R.E., and Kornberg, R.D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocystal at 4.5 Angstroms. *Science* *303*, 983-988.
- Byun, J.S., Wong, M.M., Cui, W., Idelman, G., Li, Q., De Siervi, A., Bilke, S., Haggerty, C.M., Player, A., Wang, Y.H., *et al.* (2009). Dynamic bookmarking of primary response genes by p300 and RNA polymerase II complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 19286-19291.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* *318*, 444-447.
- Chao, S.H., and Price, D.H. (2001). Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem* *276*, 31793-31799.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Albert, T.K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* *318*, 1780-1782.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* *24*, 289-296.
- Chen, R., Yang, Z., and Zhou, Q. (2004). Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA. *J Biol Chem* *279*, 4153-4160.
- Chen, Y., Sprung, R., Tang, Y., Ball, H., Sangras, B., Kim, S.C., Falck, J.R., Peng, J., Gu, W., and Zhao, Y. (2007). Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics* *6*, 812-819.
- Cheng, Z., Tang, Y., Chen, Y., Kim, S., Liu, H., Li, S.S., Gu, W., and Zhao, Y. (2009). Molecular characterization of propionyllysines in non-histone proteins. *Mol Cell Proteomics* *8*, 45-52.
- Cho, S., Schroeder, S., Kaehele, K., Kwon, H.S., Pedal, A., Herker, E., Schnoelzer, M., and Ott, M. (2009). Acetylation of cyclin T1 regulates the equilibrium between active and inactive P-TEFb in cells. *EMBO J* *28*, 1407-1417.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* *325*, 834-840.
- Coin, F., and Egly, J.M. (1998). Ten years of TFIIF. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *63*, 105-110.
- Cold Spring Harb Protoc (2006). Measuring Protein Concentration in the Presence of Nucleic Acids by A280/A260: The Method of Warburg and Christian. *Cold Spring Harb Protoc*.
- Collaborative Computational Project (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *50*, 760-763.
- Craig, A.W., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Belsham, G.J., and Sonenberg, N. (1997). The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol Cell Biol* *17*, 163-169.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* *292*, 1863-1876.

- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., *et al.* (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545-553.
- Czudnochowski, N. (2009). Biochemische Untersuchungen zur Regulation der Transkriptionselongation durch Hexim und 7SK snRNA. In *Chemie* (Dortmund, TU Dortmund).
- Czudnochowski, N., Vollmuth, F., Baumann, S., Vogel-Bachmayr, K., and Geyer, M. (2010). Specificity of Hexim1 and Hexim2 complex formation with cyclin T1/T2, importin alpha and 7SK snRNA. *J Mol Biol* **395**, 28-41.
- Dahmus, M.E. (1996). Phosphorylation of mammalian RNA polymerase II. *Methods Enzymol* **273**, 185-193.
- Dames, S.A., Schonichen, A., Schulte, A., Barboric, M., Peterlin, B.M., Grzesiek, S., and Geyer, M. (2007). Structure of the Cyclin T binding domain of Hexim1 and molecular basis for its recognition of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14312-14317.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8758-8763.
- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, A.E., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J., and Ozato, K. (2000). A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol Cell Biol* **20**, 6537-6549.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496.
- Dong, G., Chakshusmathi, G., Wolin, S.L., and Reinisch, K.M. (2004). Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *EMBO J* **23**, 1000-1007.
- Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* **24**, 280-288.
- Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* **318**, 1777-1779.
- Egloff, S., Van Herreweghe, E., and Kiss, T. (2006). Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol Cell Biol* **26**, 630-642.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.
- Feig, A.L. (2007). Applications of isothermal titration calorimetry in RNA biochemistry and biophysics. *Biopolymers* **87**, 293-301.
- Filippakopoulos, P., Keates, T., Savitsky, P., Burgess, N., Ugochukwu, E., von Delft, F., Arrowsmith, C.H., Edwards, A., Weigelt, J., Sundstrom, M., *et al.* (2007) (Structural Genomics Consortium (SGC)).
- Fletcher, T.M., and Hansen, J.C. (1995). Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *J Biol Chem* **270**, 25359-25362.
- Fong, Y.W., and Zhou, Q. (2000). Relief of two built-in autoinhibitory mechanisms in P-TEFb is required for assembly of a multicomponent transcription elongation complex at the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol* **20**, 5897-5907.
- Fraldi, A., Varrone, F., Napolitano, G., Michels, A.A., Majello, B., Bensaude, O., and Lania, L. (2005). Inhibition of Tat activity by the HEXIM1 protein. *Retrovirology* **2**, 42.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., and Lis, J.T. (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* **461**, 186-192.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B.M. (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD

- and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* 24, 787-795.
- Gajiwala, K.S., and Burley, S.K. (2000). Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10, 110-116.
- Garber, M.E., Wei, P., and Jones, K.A. (1998). HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 371-380.
- Garner, M.M., and Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9, 3047-3060.
- Garriga, J., Mayol, X., and Grana, X. (1996). The CDC2-related kinase PITALRE is the catalytic subunit of active multimeric protein complexes. *Biochem J* 319 (Pt 1), 293-298.
- Garrity, J., Gardner, J.G., Hawse, W., Wolberger, C., and Escalante-Semerena, J.C. (2007). N-lysine propionylation controls the activity of propionyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 282, 30239-30245.
- Gershey, E.L., Vidali, G., and Allfrey, V.G. (1968). Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of epsilon-N-acetyllysine in the f2a1 histone. *J Biol Chem* 243, 5018-5022.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292, 1876-1882.
- Grana, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P.P., Rosenblatt, J., Morgan, D.O., and Giordano, A. (1994). PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3834-3838.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Gupta, S., Busch, R.K., Singh, R., and Reddy, R. (1990). Characterization of U6 small nuclear RNA cap-specific antibodies. Identification of gamma-monomethyl-GTP cap structure in 7SK and several other human small RNAs. *J Biol Chem* 265, 19137-19142.
- Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* 138, 129-145.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 12, 357-369.
- Hausinger, R.P. (2004). Fell/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39, 21-68.
- Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., and Dawid, I.B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20, 2603.
- He, N., Jahchan, N.S., Hong, E., Li, Q., Bayfield, M.A., Maraia, R.J., Luo, K., and Zhou, Q. (2008). A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Mol Cell* 29, 588-599.
- He, N., Pezda, A.C., and Zhou, Q. (2006). Modulation of a P-TEFb functional equilibrium for the global control of cell growth and differentiation. *Mol Cell Biol* 26, 7068-7076.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7, 1395-1402.
- Hellman, L.M., and Fried, M.G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* 2, 1849-1861.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S., and Young, R.A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2, 43-53.
- Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (1993). Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology* 197, 601-608.

- Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (1995). Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol* **69**, 1612-1620.
- Horikawa, I., and Barrett, J.C. (2002). cDNA cloning of the human polybromo-1 gene on chromosome 3p21. *DNA Seq* **13**, 211-215.
- Horke, S., Reumann, K., Schulze, C., Grosse, F., and Heise, T. (2004). The La motif and the RNA recognition motifs of human La autoantigen contribute individually to RNA recognition and subcellular localization. *J Biol Chem* **279**, 50302-50309.
- Hottiger, M.O., and Nabel, G.J. (1998). Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J Virol* **72**, 8252-8256.
- Houzelstein, D., Bullock, S.L., Lynch, D.E., Grigorieva, E.F., Wilson, V.A., and Beddington, R.S. (2002). Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Mol Cell Biol* **22**, 3794-3802.
- Huang, B., Yang, X.D., Zhou, M.M., Ozato, K., and Chen, L.F. (2009). Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol Cell Biol* **29**, 1375-1387.
- Huang, H., Zhang, J., Shen, W., Wang, X., Wu, J., and Shi, Y. (2007). Solution structure of the second bromodomain of Brd2 and its specific interaction with acetylated histone tails. *BMC Struct Biol* **7**, 57.
- Hudson, B.P., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2000). Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain. *J Mol Biol* **304**, 355-370.
- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol* **290**, 929-941.
- IUPAC-IUB (1968). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Tentative rules. A one-letter notation for amino acid sequences. *Biochim Biophys Acta* **168**, 6-10.
- Jacks, A., Babon, J., Kelly, G., Manolaridis, I., Cary, P.D., Curry, S., and Conte, M.R. (2003). Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure* **11**, 833-843.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422-1425.
- Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.S., Brady, J.N., and Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **19**, 523-534.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* **22**, 151-153.
- Jeffrey, P.D., Tong, L., and Pavletich, N.P. (2000). Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev* **14**, 3115-3125.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Therien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., *et al.* (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* **27**, 262-274.
- Johnson, L.N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans* **37**, 627-641.
- Jones, K.A. (1997). Taking a new TAK on tat transactivation. *Genes Dev* **11**, 2593-2599.
- Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P.A., Verdin, E., and Ott, M. (2003). Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Mol Cell* **12**, 167-176.
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E., and Hart, G.W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* **268**, 10416-10424.

- Kenan, D.J., and Keene, J.D. (2004). La gets its wings. *Nat Struct Mol Biol* 11, 303-305.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., *et al.* (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J* 18, 6106-6118.
- Kim, E., Du, L., Bregman, D.B., and Warren, S.L. (1997). Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* 136, 19-28.
- Kim, H.J., Jeong, S.H., Heo, J.H., Jeong, S.J., Kim, S.T., Youn, H.D., Han, J.W., Lee, H.W., and Cho, E.J. (2004). mRNA capping enzyme activity is coupled to an early transcription elongation. *Mol Cell Biol* 24, 6184-6193.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kotik-Kogan, O., Valentine, E.R., Sanfelice, D., Conte, M.R., and Curry, S. (2008). Structural analysis reveals conformational plasticity in the recognition of RNA 3' ends by the human La protein. *Structure* 16, 852-862.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Krueger, B.J., Jeronimo, C., Roy, B.B., Bouchard, A., Barrandon, C., Byers, S.A., Searcey, C.E., Cooper, J.J., Bensaude, O., Cohen, E.A., *et al.* (2008). LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic Acids Res* 36, 2219-2229.
- Kusuhara, M., Nagasaki, K., Kimura, K., Maass, N., Manabe, T., Ishikawa, S., Aikawa, M., Miyazaki, K., and Yamaguchi, K. (1999). Cloning of Hexamethylene-bis-acetamide-inducible Transcript, HEXIM1, in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Biomed Res* 20, 273-279.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, K.K., and Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 284-295.
- Leemhuis, H., Packman, L.C., Nightingale, K.P., and Hollfelder, F. (2008). The human histone acetyltransferase P/CAF is a promiscuous histone propionyltransferase. *Chembiochem* 9, 499-503.
- LeRoy, G., Rickards, B., and Flint, S.J. (2008). The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell* 30, 51-60.
- Li, Q., Price, J.P., Byers, S.A., Cheng, D., Peng, J., and Price, D.H. (2005). Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *J Biol Chem* 280, 28819-28826.
- Lin, A., Wang, S., Nguyen, T., Shire, K., and Frappier, L. (2008a). The EBNA1 protein of Epstein-Barr virus functionally interacts with Brd4. *J Virol* 82, 12009-12019.
- Lin, Y.J., Umehara, T., Inoue, M., Saito, K., Kigawa, T., Jang, M.K., Ozato, K., Yokoyama, S., Padmanabhan, B., and Guntert, P. (2008b). Solution structure of the extraterminal domain of the bromodomain-containing protein BRD4. *Protein Sci* 17, 2174-2179.
- Lis, J.T., Mason, P., Peng, J., Price, D.H., and Werner, J. (2000). P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev* 14, 792-803.
- Liu, B., Lin, Y., Darwanto, A., Song, X., Xu, G., and Zhang, K. (2009). Identification and characterization of propionylation at histone H3 lysine 23 in mammalian cells. *J Biol Chem* 284, 32288-32295.
- Liu, Y., Wang, X., Zhang, J., Huang, H., Ding, B., Wu, J., and Shi, Y. (2008). Structural basis and binding properties of the second bromodomain of Brd4 with acetylated histone tails. *Biochemistry* 47, 6403-6417.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Malik, S., and Roeder, R.G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30, 256-263.

- Mancebo, H.S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., *et al.* (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev* 11, 2633-2644.
- Maraia, R.J., and Intine, R.V. (2001). Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* 21, 367-379.
- Markert, A., Grimm, M., Martinez, J., Wiesner, J., Meyerhans, A., Meyuhas, O., Sickmann, A., and Fischer, U. (2008). The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep* 9, 569-575.
- Marmorstein, R., and Berger, S.L. (2001). Structure and function of bromodomains in chromatin-regulating complexes. *Gene* 272, 1-9.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D.H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* 271, 27176-27183.
- Marshall, N.F., and Price, D.H. (1992). Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* 12, 2078-2090.
- Marshall, N.F., and Price, D.H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem* 270, 12335-12338.
- Martinez-Balbas, M.A., Dey, A., Rabindran, S.K., Ozato, K., and Wu, C. (1995). Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell* 83, 29-38.
- Mathews, M.B., and Francoeur, A.M. (1984). La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylylate tail of a small RNA. *Mol Cell Biol* 4, 1134-1140.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., and Bentley, D.L. (1997b). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* 11, 3306-3318.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19, 1401-1415.
- Michels, A.A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T.E., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Sedore, S.C., Price, J.P., Price, D.H., Lania, L., *et al.* (2004). Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J* 23, 2608-2619.
- Michels, A.A., Nguyen, V.T., Fraldi, A., Labas, V., Edwards, M., Bonnet, F., Lania, L., and Bensaude, O. (2003). MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol Cell Biol* 23, 4859-4869.
- Mori, Y., Sato, F., Selaru, F.M., Oлару, A., Perry, K., Kimos, M.C., Tamura, G., Matsubara, N., Wang, S., Xu, Y., *et al.* (2002). Instability typing reveals unique mutational spectra in microsatellite-unstable gastric cancers. *Cancer Res* 62, 3641-3645.
- Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A.L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., *et al.* (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461, 664-668.
- Morris, J.R., Geyer, P.K., and Wu, C.T. (1999). Core promoter elements can regulate transcription on a separate chromosome in trans. *Genes Dev* 13, 253-258.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Yan, S., Plotnikova, O., Sachchidanand, Sanchez, R., Zeleznik-Le, N.J., Ronai, Z., and Zhou, M.M. (2004). Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation. *Mol Cell* 13, 251-263.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.
- Naar, A.M., Lemon, B.D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 70, 475-501.
- Nakamura, Y., Umehara, T., Nakano, K., Jang, M.K., Shirouzu, M., Morita, S., Uda-Tochio, H., Hamana, H., Terada, T., Adachi, N., *et al.* (2007). Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4. *J Biol Chem* 282, 4193-4201.

- Nechaev, S., Fargo, D.C., dos Santos, G., Liu, L., Gao, Y., and Adelman, K. Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* 327, 335-338.
- Nguyen, V.T., Kiss, T., Michels, A.A., and Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322-325.
- Ohndorf, U.M., Steegborn, C., Knijff, R., and Sondermann, P. (2001). Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity. *J Biol Chem* 276, 27188-27196.
- Ornaghi, P., Ballario, P., Lena, A.M., Gonzalez, A., and Filetici, P. (1999). The bromodomain of Gcn5p interacts in vitro with specific residues in the N terminus of histone H4. *J Mol Biol* 287, 1-7.
- Ott, M., Schnolzer, M., Garnica, J., Fischle, W., Emiliani, S., Rackwitz, H.R., and Verdin, E. (1999). Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* 9, 1489-1492.
- Ottinger, M., Christalla, T., Nathan, K., Brinkmann, M.M., Viejo-Borbolla, A., and Schulz, T.F. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the short variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest. *J Virol* 80, 10772-10786.
- Owen-Hughes, T., and Workman, J.L. (1994). Experimental analysis of chromatin function in transcription control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 4, 403-441.
- Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* 19, 6141-6149.
- Pearce, J.J., Singh, P.B., and Gaunt, S.J. (1992). The mouse has a Polycomb-like chromobox gene. *Development* 114, 921-929.
- Pei, Y., Schwer, B., and Shuman, S. (2003). Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control. *J Biol Chem* 278, 7180-7188.
- Peng, J., Marshall, N.F., and Price, D.H. (1998a). Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb. *J Biol Chem* 273, 13855-13860.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T., and Price, D.H. (1998b). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 12, 755-762.
- Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23, 297-305.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.
- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141, 432-445.
- Rupp, B. (2010). *Biomolecular Crystallography*, 1st edn (Garland Scientific).
- Ryder, S.P., Recht, M.I., and Williamson, J.R. (2008). Quantitative analysis of protein-RNA interactions by gel mobility shift. *Methods Mol Biol* 488, 99-115.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 557-567.
- Schonichen, A., Bigalke, J.M., Urbanke, C., Grzesiek, S., Dames, S.A., and Geyer, M. (2010). A Flexible Bipartite Coiled Coil Structure Is Required for the Interaction of Hexim1 with the P-TEFb Subunit Cyclin T1. *Biochemistry*.
- Schulman, B.A., Lindstrom, D.L., and Harlow, E. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10453-10458.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schonichen, A., Blazek, D., Peterlin, B.M., and Geyer, M. (2005). Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 280, 24968-24977.

- Schweiger, M.R., Ottinger, M., You, J., and Howley, P.M. (2007). Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins. *J Virol* **81**, 9612-9622.
- Shen, W., Xu, C., Huang, W., Zhang, J., Carlson, J.E., Tu, X., Wu, J., and Shi, Y. (2007). Solution structure of human Brg1 bromodomain and its specific binding to acetylated histone tails. *Biochemistry* **46**, 2100-2110.
- Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem* **72**, 693-715.
- Sims, R.J., 3rd, Mandal, S.S., and Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 263-271.
- Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* **72**, 449-479.
- Smith, B.C., and Denu, J.M. (2007). Acetyl-lysine analog peptides as mechanistic probes of protein deacetylases. *J Biol Chem* **282**, 37256-37265.
- Stefano, J.E. (1984). Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* **36**, 145-154.
- Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 435-459.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Svejstrup, J.Q., Li, Y., Fellows, J., Gnatt, A., Bjorklund, S., and Kornberg, R.D. (1997). Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6075-6078.
- Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C., and Kennison, J.A. (1992). brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561-572.
- Teplova, M., Yuan, Y.R., Phan, A.T., Malinina, L., Ilin, S., Teplov, A., and Patel, D.J. (2006). Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Mol Cell* **21**, 75-85.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-816.
- Ullu, E., and Melli, M. (1982). Cloning and characterization of cDNA copies of the 7S RNAs of HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **10**, 2209-2223.
- Umehara, T., Nakamura, Y., Jang, M.K., Nakano, K., Tanaka, A., Ozato, K., Padmanabhan, B., and Yokoyama, S. (2010). Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain. *J Biol Chem* **285**, 7610-7618.
- Urano, E., Kariya, Y., Futahashi, Y., Ichikawa, R., Hamatake, M., Fukazawa, H., Morikawa, Y., Yoshida, T., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., *et al.* (2008). Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett* **582**, 4053-4058.
- Vagin, A., and Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 22-25.
- Van Herreweghe, E., Egloff, S., Goiffon, I., Jady, B.E., Froment, C., Monsarrat, B., and Kiss, T. (2007). Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb. *EMBO J* **26**, 3570-3580.
- VanDemark, A.P., Kasten, M.M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C.P., and Cairns, B.R. (2007). Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Mol Cell* **27**, 817-828.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., and McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13**, 213-217.
- Vollmuth, F., Blankenfeldt, W., and Geyer, M. (2009). Structures of the dual bromodomains of the P-TEFb-activating protein Brd4 at atomic resolution. *J Biol Chem* **284**, 36547-36556.

- Vossenaar, E.R., Zendman, A.J., van Venrooij, W.J., and Pruijn, G.J. (2003). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25, 1106-1118.
- Walsh, C.T. (2006). *Posttranslational Modification of Protein* (Roberts and Company Publisher).
- Wang, W., Carey, M., and Gralla, J.D. (1992). Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* 255, 450-453.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., *et al.* (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyl elimination. *Science* 306, 279-283.
- Wassarman, D.A., and Steitz, J.A. (1991). Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein (RNP), the most abundant human small RNP of unknown function. *Mol Cell Biol* 11, 3432-3445.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18, 123-131.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92, 451-462.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
- Wimmer, J., Fujinaga, K., Taube, R., Cujec, T.P., Zhu, Y., Peng, J., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (1999). Interactions between Tat and TAR and human immunodeficiency virus replication are facilitated by human cyclin T1 but not cyclins T2a or T2b. *Virology* 255, 182-189.
- Winston, F., and Allis, C.D. (1999). The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* 6, 601-604.
- Wittmann, B.M., Wang, N., and Montano, M.M. (2003). Identification of a novel inhibitor of breast cell growth that is down-regulated by estrogens and decreased in breast tumors. *Cancer Res* 63, 5151-5158.
- Wolin, S.L., and Cedervall, T. (2002). The La protein. *Annu Rev Biochem* 71, 375-403.
- Wu, S.Y., and Chiang, C.M. (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 282, 13141-13145.
- Xue, Y., Yang, Z., Chen, R., and Zhou, Q. (2010). A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic Acids Res* 38, 360-369.
- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* 21, 227-237.
- Yang, X., Gold, M.O., Tang, D.N., Lewis, D.E., Aguilar-Cordova, E., Rice, A.P., and Herrmann, C.H. (1997). TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12331-12336.
- Yang, Z., He, N., and Zhou, Q. (2008). Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 28, 967-976.
- Yang, Z., Yik, J.H., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* 19, 535-545.
- Yang, Z., Zhu, Q., Luo, K., and Zhou, Q. (2001). The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 414, 317-322.
- Yik, J.H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J.L., Link, A.J., and Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* 12, 971-982.
- Yik, J.H., Chen, R., Pezda, A.C., Samford, C.S., and Zhou, Q. (2004). A human immunodeficiency virus type 1 Tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for

- HEXIM1 to inhibit RNA polymerase II transcription through 7SK snRNA-mediated inactivation of P-TEFb. *Mol Cell Biol* **24**, 5094-5105.
- You, J., Srinivasan, V., Denis, G.V., Harrington, W.J., Jr., Ballestas, M.E., Kaye, K.M., and Howley, P.M. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen interacts with bromodomain protein Brd4 on host mitotic chromosomes. *J Virol* **80**, 8909-8919.
- Zeng, L., Zhang, Q., Gerona-Navarro, G., Moshkina, N., and Zhou, M.M. (2008). Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300. *Structure* **16**, 643-652.
- Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**, 124-128.
- Zhang, J., Tamilarasu, N., Hwang, S., Garber, M.E., Huq, I., Jones, K.A., and Rana, T.M. (2000). HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *J Biol Chem* **275**, 34314-34319.
- Zhang, K., Chen, Y., Zhang, Z., and Zhao, Y. (2009). Identification and verification of lysine propionylation and butyrylation in yeast core histones using PTMap software. *J Proteome Res* **8**, 900-906.
- Zhou, M., Halanski, M.A., Radonovich, M.F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D.H., and Brady, J.N. (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* **20**, 5077-5086.
- Zhou, Q., and Yik, J.H. (2006). The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 646-659.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B., and Price, D.H. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* **11**, 2622-2632.
- Zieve, G., Benecke, B.J., and Penman, S. (1977). Synthesis of two classes of small RNA species in vivo and in vitro. *Biochemistry* **16**, 4520-4525.
- Zieve, G., and Penman, S. (1976). Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization. *Cell* **8**, 19-31.
- Zippo, A., Serafini, R., Rocchigiani, M., Pennacchini, S., Krepelova, A., and Oliviero, S. (2009). Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell* **138**, 1122-1136.

Danksagung

Ich danke

PD Dr. Matthias Geyer für die Entwicklung und Betreuung der Brd4- und Larp7-Projekte, unzählige Diskussionen und Anregungen sowie für die praktische und fachliche Unterstützung meiner Ausbildung und Doktorarbeit

Prof. Dr. Martin Engelhard für die Übernahme des Erstgutachtens sowie für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit

Prof. Dr. Roger S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung

Prof. Dr. Roland Winter für die Übernahme des Zweitgutachtens

PD Dr. Wulf Blankenfeldt für die Ausbildung und Anleitung in der Protein-kristallographie

den Mitgliedern der Kristallographie-Gemeinschaft der Max-Planck-Institute Dortmund und Heidelberg für die Aufnahme von Datensätzen am Synchrotron und für die Hilfsbereitschaft im Kristallisationslabor

Prof. Dr. Christian Herrmann und Mark Wehner für den unkomplizierten Zugang zu ihrem iTC200 und wertvolle Ratschläge zu ITC-Experimenten

Meinen Arbeitsgruppenkollegen André, Antje, Bernhard, Christian, Conny, Diana, Florian H., Florian K., Holger, Jana, Janna, Karin, Karl-Heinz, Nadine, Santiago, Sebastian und Sonja für fachliche und moralische Ratschläge, die angenehme Zusammenarbeit und die schöne Zeit in der AG Geyer

der Abteilung III des Max-Planck-Institut Dortmunds für eine tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bei allen Fragen

der International Max Planck Research School in Chemische Biologie (IMPRS-CB) für Finanzierung und Ausbildung

der Fakultät für Chemie für die Möglichkeit der Promotion an der Technischen Universität Dortmund

Aymelt, meinen Eltern sowie meinen Mädels für die uneingeschränkte Unterstützung, ihre Geduld und den Rückhalt, den sie mir gegeben haben.



Lebenslauf

Persönliche Daten

Nachname: Vollmuth
Vorname: Friederike Hella
Adresse: Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,
Otto-Hahn-Str.11
44227 Dortmund
Telefonnummer: 0231/133 2307
E-mail-Adresse: friederike.vollmuth@mpi-dortmund.mpg.de
Nationalität: Deutsch
Geburtsdatum/-ort: 15. September 1981, Mülheim an der Ruhr
Geschlecht: Weiblich
Familienstand: Ledig

Promotion

Seit Nov. 2006 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,
Dortmund, Abteilung für Physikalische Biochemie (Direktor:
Prof. Dr. R. Goody), Thema: Strukturelle Untersuchungen zur
Regulation humaner Transkriptionsfaktoren

Studium

Okt.. 2001 – Aug. 2006 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Sep. 2003 Vordiplom in Biologie
Jan. 2004 – Mär. 2004 Forschungspraktikum "Codon-Optimierung, Expression und
Reinigung der C-terminalen Domäne des Formin-Homologie-
Protein FHOD1" am Max-Planck-Institut für molekulare Physio-
logie, Dortmund, Abteilung für Physikalische Biochemie,
Jul. 2004 – Aug. 2004 Forschungspraktikum "Biochemie der Zellorganelle", Lehrstuhl
für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät, Ruhr-
Universität Bochum
Jan. 2005 – Mär. 2005 Forschungspraktikum "Isolierung, Reinigung und Rückfaltung
des Lichtsammelkomplexes aus *Amphidinium carterae*", Lehr-
stuhl für Biophysik, Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bo-
chum
Okt. 2005 – Aug. 2006 Diplomarbeit "Biochemische Analysen zur Regulation des hu-
manen Transkriptionelongationsfaktors P-TEFb durch das
Tumorsuppressorprotein Hexim2" am Max-Planck-Institut für
molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung für Physikalische
Biochemie (Direktor: Prof. Dr. R. Goody)
Okt. 2006 Abschluss des Studiums durch Erhalt des Grades einer Diplom-
Biologin

Schulische Ausbildung

- Aug. 1988 – Jun. 1992 Grundschule Steigerweg, Mülheim an der Ruhr
- Aug. 1992 – Jun. 2001 Gesamtschule Gustav-Heinemann-Schule,
Mülheim an der Ruhr
- Jun. 2001 Allgemeine Hochschulreife, Gustav-Heinemann-
Schule, Mülheim an der Ruhr

Zusätzliche berufliche Tätigkeiten

- Nov. 2003 – Jan. 2004 Arbeit als Studentische Hilfskraft bei Jun.-Prof. Dr. E. Hofmann,
Lehrstuhl für Biophysik, Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität
Bochum: Organisation einer Literatur-Datenbank

Eidesstattliche Erklärung

Die selbstständige und eigenhändige Anfertigung dieser Dissertation versichere ich an Eides statt.

Dortmund, den 7. Juni 2010

Friederike Vollmuth