

Analyse der Regulation von
P-TEFb durch
Hexim1, 7SK snRNA und Larp7

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

Janna Margareta Bigalke, M.Sc.

aus Aachen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis Juli 2011 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. EINLEITUNG	1
1.1 Eukaryotische Transkription	1
1.1.1 Die RNA-Polymerase II	2
1.1.2 Transkriptionsinitiation	4
1.1.3 Transkriptionselongation	5
1.1.4 Transkriptionstermination	7
1.2 Regulation der Transkriptionselongation	7
1.2.1 Modifikationen der CTD	7
1.2.2 Promoter-proximales Pausieren	9
1.3 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen	11
1.3.1 P-TEFb	12
1.4 Negative und positive Regulation von P-TEFb.....	14
1.4.1 Hexim1.....	15
1.4.2 7SK snRNA.....	18
1.4.3 Larp7.....	19
1.4.4 BCDIN3 (MePCE).....	20
1.4.5 Brd4	21
1.5 Fehlregulation von P-TEFb.....	22
1.5.1 P-TEFb und HIV-1	23
1.5.2 P-TEFb und Krebs	25
1.6 Zielsetzung	26
2. MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1 Materialien und Geräte	29
2.1.1 Chemikalien	29
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.3 Molekularbiologische Kits	29
2.1.4 Chromatographiesäulen und –materialien	29
2.1.5 Größenstandards.....	30
2.1.6 Enzyme und Proteine	30
2.1.7 DNA-Konstrukte.....	30
2.1.8 Mikroorganismen und Zelllinien.....	30
2.1.9 Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie.....	30
2.2 Molekularbiologische Methoden	32
2.2.1 Polymerasekettenreaktion	32
2.2.2 Mega-Primer Mutagenese	33
2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	33

2.2.4 Restriktionsverdau	34
2.2.5 Ligation.....	34
2.2.6 Transformation von Bakterien.....	34
2.2.7 Plasmidpräparation	35
2.2.8 DNA-Sequenzierung	35
2.2.9 Glycerindauerkulturen.....	35
2.2.10 In vitro Synthese von RNAs	36
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	36
2.3.1 Proteinexpression in E. coli.....	36
2.3.2 Zellaufschluss	36
2.3.3 Affinitätschromatographie	37
2.3.4 Proteolytischer Verdau.....	38
2.3.5 Präparative Größenausschlusschromatographie	38
2.3.6 Ionenaustauschchromatographie.....	39
2.3.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.3.8 Elektrophoretischer Mobilitätsverschiebungstest (EMSA)	41
2.3.9 Denaturierende Urea-Polyacrylamidgelelektrophorese (Urea-PAGE)	42
2.3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
2.3.11 Konzentrierung der Proteine	43
2.3.12 Analytische Größenausschlusschromatographie	43
2.3.13 Acetonfällung von Proteinen	44
2.3.14 Lithiumchlorid-Isopropanolfällung von RNA.....	44
2.3.15 GST-Immobilisationsexperiment.....	44
2.3.16 Gradientenzentrifugation.....	45
2.3.17 Thermofluoruntersuchungen	45
2.4 Zellbiologische Methoden	46
2.4.1 Transformation und Transposition	46
2.4.2 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA.....	46
2.4.3 Kultivierung von Sf21 Zellen	46
2.4.4 Transfektion von Sf21 Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA	47
2.4.5 Plaque-Assay	47
2.4.6 Virusamplifikation	48
2.4.7 Proteinexpression in Sf21 Zellen	48
2.5 Biophysikalische Methoden	48
2.5.1 Massenspektrometrie.....	48
2.5.2 Isothermale Titrationskalorimetrie.....	49
2.5.3 Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie).....	50
2.5.4 Dynamische Lichtstreuung.....	50

2.6	Strukturbiologische Methoden	51
2.6.1	Proteinkristallisation.....	51
2.6.2	Datenaufnahme	53
2.6.3	Das Phasenproblem	53
2.6.4	Single wavelength anomalous dispersion (SAD)	53
2.6.5	Datenprozessierung, Modellbau und Verfeinerung	55
2.6.6	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	56
2.6.7	Elektronenmikroskopie	57
3.	ERGEBNISSE	59
3.1	Hexim1 TBD(Δ stammer) bildet ein kontinuierliches <i>coiled coil</i>	59
3.1.1	Darstellung des Cyclin T1/Hexim1 TBD(Δ stammer) Komplexes	60
3.1.2	Kristallisation des Cyclin T1/Hexim1 TBD(Δ stammer) Komplexes	61
3.1.3	Struktur von Hexim1 TBD(Δ stammer).....	62
3.1.4	Geometrische Analyse von Hexim1 TBD und Hexim1 TBD(Δ stammer).....	67
3.2	Strukturelle Untersuchung von P-TEFb/Hexim1	71
3.2.1	Darstellung der P-TEFb/Hexim1 Komplexe	71
3.2.2	Strukturelle Untersuchungen des P-TEFb/Hexim1 Komplexes	73
3.3	Larp7 und die Interaktion mit 7SK snRNA.....	76
3.3.1	Strukturelle Untersuchungen zu Larp7	81
3.3.2	Analyse der Interaktion von Larp7, 7SK snRNA und Hexim1	85
3.3.3	Analyse der Interaktion von Larp7, 7SK snRNA und BCDIN3	86
3.4	Darstellung des vollständigen 7SK snRNP und primäre strukturelle Charakterisierung.....	88
3.5	Komplexformierung von Cyclin T1, HIV-1 Tat und TAR.....	96
4.	DISKUSSION	99
4.1	Regulation des P-TEFb Komplexes durch Hexim1	99
4.1.1	Strukturelle Untersuchung von Hexim1 TBD(Δ stammer).....	99
4.1.2	Interaktion von P-TEFb mit Hexim1.....	101
4.2	Die 7SK snRNA-Larp7 Interaktion.....	103
4.2.1	Interaktion von Larp7 mit Hexim1 und BCDIN3	107
4.3	Rekonstitution des 7SK snRNPs	109
4.4	Rekonstitution des Cyclin T1/Tat/TAR-Komplexes	111
5.	ZUSAMMENFASSUNG	113
6.	LITERATURVERZEICHNIS	115
7.	ANHANG	129
7.1	Übersicht über die verwendeten Protein- und RNA-Konstrukte	129
7.2	TWISTER-Analyse	129
7.3	DLS des P-TEFb/Hexim1 (194-316) Komplexes.....	130
7.4	Substanzen der Thermofluor-Analyse.....	130
7.5	Lebenslauf	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
A	Ampere
Å	Angström
al.	lat.: <i>alii</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	engl.: <i>arginine rich motif</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl.: <i>arbitrary units</i>
BCDIN3	engl.: <i>bicoid-interacting protein 3 homolog</i>
BET	Bromodomänen und extraterminale Domänen
Bis Tris	Bis[2-hydroxyethyl]imino-Tris[hydroxymethyl]methan
BIV	Bovines Immundefizienzvirus
bp	Basenpaar
Brd4	engl.: <i>bromodomain-containing protein 4</i>
BSA	bovines Serum-Albumin
C	Celsius
CD	Circulardichroismus
Cdk	engl.: <i>cyclin dependent kinase</i>
Clp1	engl.: <i>cardiac lineage protein 1</i>
CPSF	engl.: <i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
CstF	engl.: <i>cleavage stimulatory factor</i>
CTD	C-terminale Domäne
C-Terminus	Carboxyterminus der Proteinprimärsequenz
Cyc	Cyclin
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DLS	engl.: <i>dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DRB	5,6-dichloro-1-beta-D-Ribofuranosylbenzimidazol
DSIF	DRB-Sensitivität induzierender Faktor
DTE	Dithioerythritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDG1	engl.: <i>estrogen-down-regulated gene 1</i>
EDTA	engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEC	engl.: <i>early elongation complex</i>
EG	Ethylenglykol
EIAV	equines infektiöses Anämievirus
EMSA	engl.: <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ENL	engl.: <i>eleven-nineteen leukemia</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
g	Gramm
GSH	Gluthation
GST	Gluthation S-Transferase
GTF	Generelle Transkriptionsfaktoren
HAT	Histonacetyltransferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
Hexim1	engl.: <i>hexamethylene bisacetamide inducible protein 1</i>
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HMBA	Hexamethylenbisacetamid
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
Hxm	Hexim
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactosid
ITC	engl.: <i>initially transcribing complex</i>

ITC	engl.: <i>isothermal titration calorimetry</i>
JDV	engl.: <i>Jembrana disease virus</i>
K	Kelvin
kb	Kilobase
K _d	Dissoziationskonstante
L	Liter
LAM	La-Motiv
Larp7	engl.: <i>La-related protein 7</i>
LB	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LMW	engl.: <i>low molecular weight marker</i>
LTR	engl.: <i>long terminal repeats</i>
M = mol/L	Molar
m	Meter
MAQ1	franz.: <i>ménage à quatre 1</i>
MBP	engl.: <i>maltose-binding protein</i>
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i>
MePCE	engl.: <i>7SK snRNA methylphosphate capping enzyme</i>
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
MOI	engl.: <i>multiplicity of infection</i>
MPD	2-methyl-2,4-pentandiol
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
MW	engl.: <i>molecular weight</i>
MWCO	engl.: <i>Molecular Weight Cut Off</i>
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
ncRNA	nicht-kodierende RNA
NELF	Negativer Elongationsfaktor
Ni-NTA	Nickel-nitrilo-Triessigsäure
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus der Proteinprimärsequenz
OD	Optische Dichte
PAGE	engl.: <i>polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
pdb	engl.: <i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
pfu	engl.: <i>plaque forming unit</i>
PIC	engl.: <i>pre-initiation complex</i>
PIP7S	engl.: <i>P-TEFb-interaction protein for 7SK stability</i>
Pol	Polymerase
P-TEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
r.m.s.d.	engl.: <i>root mean square deviation</i>
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Rotationen pro Minute
RRM	engl.: <i>RNA recognition motif</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SAD	engl.: <i>single wavelength anomalous dispersion</i>
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SAXS	engl.: <i>small angle X-ray scattering</i>
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	engl.: <i>super elongation complex</i>
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
snRNA	engl.: <i>small nuclear RNA</i>
snRNP	engl.: <i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
sog.	sogenannt

TAR	engl.: <i>transactivation response element</i>
Tat	Transaktivator der Transkription
TBD	Cyclin T-bindende Domäne
TBP	TATA bindendes Protein
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	engl.: <i>tobacco etch virus</i>
TOF	engl.: <i>time of flight</i>
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris-[hydroxymethyl]-Aminomethan
TRM	engl.: <i>Tat/TAR-recognition motif</i>
tRNA	Transfer-RNA
V	Volt
V _M	Matthew's Koeffizient
wt	Wildtyp

Aminosäuren

Ala = A	Alanin
Arg = R	Arginin
Asn = N	Asparagin
Asp = D	Aspartat
Cys = C	Cystein
Gln = Q	Glutamin
Glu = E	Glutamat
Gly = G	Glycin
His = H	Histidin
Ile = I	Isoleucin
Leu = L	Leucin
Lys = K	Lysin
Met = M	Methionin
Phe = F	Phenylalanin
Pro = P	Prolin
Ser = S	Serin
Thre = T	Threonin
Trp = W	Tryptophan
Tyr = Y	Tyrosin
Val = V	Valin

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1. EINLEITUNG

1.1 Eukaryotische Transkription

Die Erbinformation ist in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl.: *deoxyribonucleic acid*) gespeichert, die in eukaryotischen Zellen im Zellkern in Chromatinstrukturen verpackt ist. Die Bausteine der DNA sind Zucker (Desoxyribose), Phosphat und vier verschiedene Basen, durch deren spezifische Anordnung der genetische Code entsteht. Die DNA liegt als Doppelhelix vor, wobei sich die Watson-Crick Basenpaarungen Adenin/Thymin und Guanin/Cytosin ergeben (Watson and Crick, 1953). Drei aufeinanderfolgende Basen, die ein sog. Codon bilden, werden bei der Translation in eine bestimmte Aminosäure übersetzt. Das humane Genom umfasst mehr als drei Milliarden Basenpaare. In linearisierter Form würde die DNA die Größe jeder Zelle bei Weitem übertreffen, daher liegt die DNA im Zellkern in kondensierter Form in insgesamt 2 x 23 Chromosomen vor. Die DNA ist dabei um Proteinkomplexe, die Histone, gewickelt und bildet eine Einheit, die als Nukleosom bezeichnet wird (Richmond et al., 1984). Positive Ladungen (Seitenketten von Lysin oder Arginin) der Histone interagieren hier mit dem Phosphatrückgrat der DNA.

Sowohl während der Transkription als auch während der Replikation, werden die Nukleosomen teilweise aufgelöst, so dass die DNA für die Transkriptions- bzw. Replikationsmaschinerie zugänglich wird. Im Falle der Transkription wird die DNA von einer Reihe von Transkriptionsfaktoren und von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen gebunden. Diese Klasse von Enzymen transkribiert die DNA in RNA (engl.: *ribonucleic acid*), welche neben ihrer Aufgabe in der Proteinbiosynthese weitere vielfältige Rollen in der Zelle einnimmt (siehe Abbildung 1). RNA unterscheidet sich von DNA in ihrer Zusammensetzung. Der Zuckerbaustein ist hier Ribose und statt der Base Thymin wird Uracil verwendet. Zudem ist RNA in eu- und prokaryotischen Zellen einzelsträngig.

Die Boten-RNA (mRNA, engl.: *messenger RNA*) dient als Matrize für die Proteinbiosynthese. Nach der Reifung wird sie aus dem Nukleus in das Zytosol transportiert und lagert sich an die 40S Untereinheit des Ribosoms an. Die ribosomalen Untereinheiten bestehen ihrerseits aus ribosomaler RNA (rRNA, engl.: *ribosomal RNA*) und einer Vielzahl von Proteinen. Passend zum mRNA Startcodon bringt die Transfer-RNA (tRNA, engl.: *transfer RNA*) die initiale Aminosäure Methionin zum Ribosom, welches sich anschließend durch Anlagerung der 60S Untereinheit final assembliert. Weitere nicht-codierende RNAs (ncRNA, engl.: *non-coding RNA*) sind an mannigfaltigen Prozessen als Regulatoren oder Ribozyme in der Zelle beteiligt. So sind zum Beispiel

einige kleine nukleäre RNAs (snRNA, engl.: *small nuclear RNA*) in der RNA-Prozessierung involviert, andere wie die 7SK snRNA können transkriptionale Prozesse regulieren. Neben den Nucleinsäuren ist eine Vielzahl von Proteinen notwendig, um zelluläre Vorgänge zu steuern und zu regulieren.

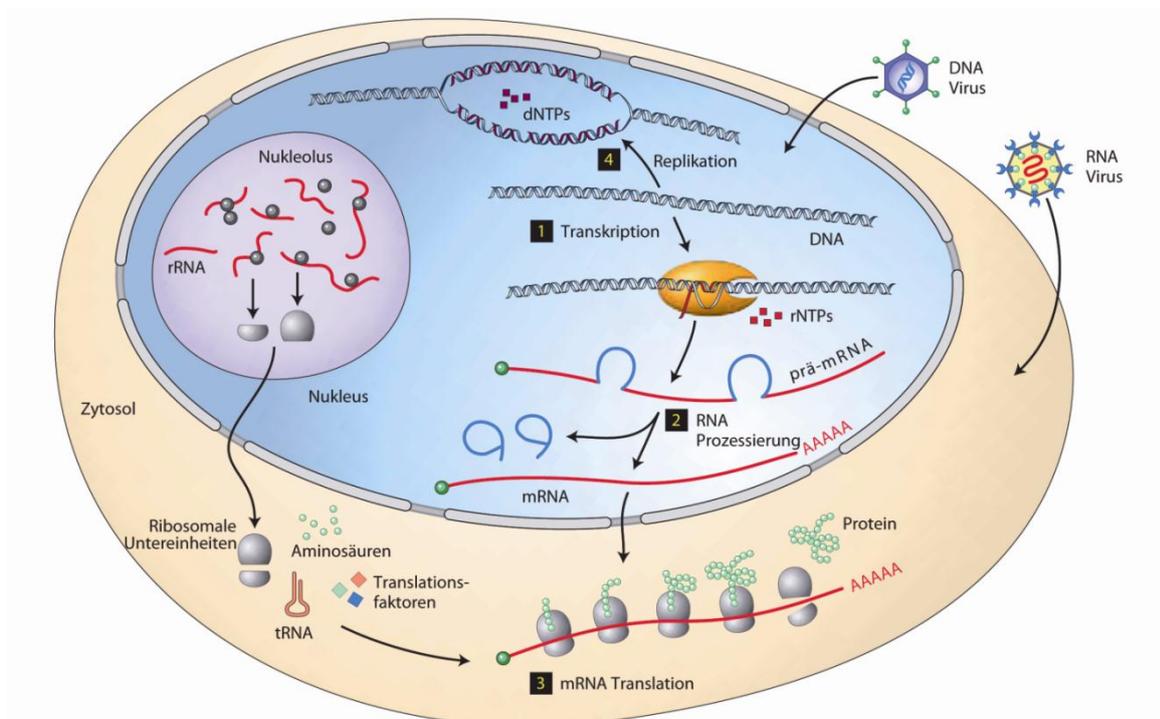


Abbildung 1: Übersicht über die Verwendung der Erbinformation. (1) Während der Transkription eines kodierenden Gens wird die DNA durch die RNA-Polymerase II in prä-mRNA umgeschrieben. (2) Daraufhin folgt die Prozessierung der prä-mRNA, die das Spleißen und die Polyadenylierung umfasst. (3) Nach dem Transport in das Zytoplasma dient die mRNA als Matrize für die Proteinbiosynthese durch die Ribosomen. Diese bestehen aus zwei Untereinheiten, welche sich im Nucleolus aus rRNA und Proteinen assemblieren. tRNA assistiert in der Proteinsynthese als *Carrier* für die Aminosäuren. (4) Vor der Zellteilung findet die Replikation statt, bei welcher die DNA-Polymerase die gesamte Erbinformation kopiert (nach Lodish et al., 2003).

Der Transkriptionsprozess als zentrales Element der Genexpression lässt sich in drei Phasen einteilen: Initiation, Elongation und Termination. Jede einzelne dieser Phasen wird stark kontrolliert und reguliert, um eine Über-, aber auch Unterproduktion an mRNA zu vermeiden. Durch diese strenge Kontrolle kann die Zelle zudem schnell auf äußere Einflüsse und Signale reagieren. Fehler in der Transkriptionsregulation können zu schwerwiegenden metabolischen Störungen führen (Villard, 2004).

1.1.1 Die RNA-Polymerase II

In eukaryotischen Zellen gibt es drei verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen: RNA-Polymerase I, II und III (RNA Pol I, II, III). Es handelt sich hierbei um große Proteinkomplexe aus 8 bis 14 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von über 500 kDa. Jede dieser Polymerasen katalysiert die Transkription verschiedener RNA-

Typen. Die RNA Pol I befindet sich im Nukleolus und ist für die Synthese von Vorläufer-rRNA verantwortlich, welche zu 28S, 5,8S und 18S rRNA prozessiert werden. Diese Untereinheiten sind Teil des Ribosoms. Die RNA Pol II und III sind im Nukleoplasma lokalisiert, wo die RNA Pol III die tRNAs, 5S rRNA und weitere kleine ncRNAs wie zum Beispiel die im Spleißen involvierte U6 RNA transkribiert (Brow and Guthrie, 1988). Die Synthese sämtlicher prä-mRNAs und einiger snRNAs wird schließlich von der RNA Pol II katalysiert (Fuda et al., 2009). Die vorliegende Studie beschäftigt sich ausschließlich mit den RNA Pol II begleitenden Prozessen.

Die humane RNA Pol II besteht aus zwei großen und zehn kleineren Untereinheiten (siehe Abbildung 2). Die größte Untereinheit Rpb1 (gelb) und die zweitgrößte Untereinheit Rpb2 (grün) sind hochkonserviert und bilden das katalytische Zentrum der Polymerase. Dieses ist über eine Art Tunnel zugänglich, in dem die einzelsträngige DNA-Vorlage (rot) gebunden wird. Nach der Synthese der komplementären prä-mRNA (blau) wird diese über einen Austrittskanal nach außen geleitet. Die enzymatische Reaktion des Nukleotideinbaus erfolgt Mg^{2+} -abhängig mit einer Geschwindigkeit von etwa 25 nt/s. Im Gegensatz zu allen anderen RNA- oder DNA-Polymerasen beinhaltet Rpb1 von RNA Pol II eine 378 Aminosäure lange C-terminale Heptadwiederholungs-

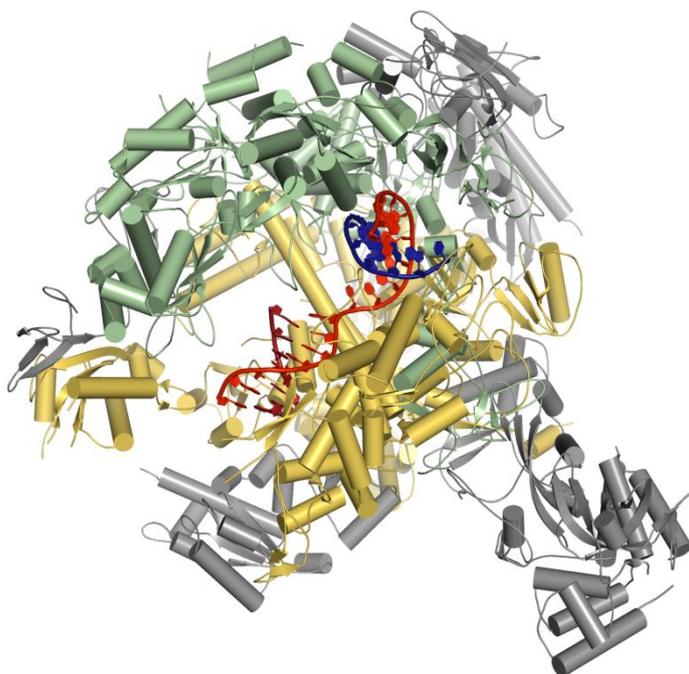


Abbildung 2: RNA Polymerase II Elongationskomplex. Die DNA-Matrize ist in rot dargestellt, die neu synthetisierte mRNA in blau. Rpb1 (gelb) und Rpb2 (grün) bilden das katalytische Zentrum der Polymerase. Weitere Untereinheiten sind in grau dargestellt. Die CTD von Rpb1 ist nicht aufgelöst (pdb-Code: 3HOY; Sydow et al., 2009).

sequenz, die CTD (engl.: *carboxy terminal domain*; Saunders et al., 2006). In der humanen RNA Pol II gibt es 52 nahezu exakte Wiederholungen der Konsensus-Sequenz YSPTSPS (Prelich, 2002), in Hefen findet man dagegen nur 26 Heptapeptidwiederholungen. Die CTD ist essentiell für die Aktivität dieser Polymerase (Brickey and Greenleaf, 1995). An der CTD erfolgen während der Transkription multiple Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen, die den Transkriptionsprozess maßgeblich regulieren (Chapman et al., 2008; Meinhart et al., 2005). Diese Modifikationen bewirken vermutlich Konformationsänderungen innerhalb der RNA Pol II, wodurch die Affinität zu Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Auf die genaue Umgestaltung der CTD wird in Abschnitt 1.2.1 näher eingegangen.

1.1.2 Transkriptionsinitiation

Die Transkriptionsinitiation beschreibt den Prozess, bei welchem die RNA Pol II an den Genpromoter rekrutiert, die doppelsträngige DNA lokal entwunden und mit der Synthese der mRNA begonnen wird (besprochen in Nechaev and Adelman, 2011). Die Erkennung des Promoters erfolgt durch die Assemblierung eines großen Komplexes aus einigen generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs, engl.: *general transcription factors*) und der RNA Pol II an dem Promoter (Cramer, 2004; Hahn, 2004). Diesen Komplex bezeichnet man als Präinitiationskomplex (PIC, engl.: *pre initiation complex*; siehe Abbildung 3). Die beteiligten Transkriptionsfaktoren sind TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH, wobei TFIID das TATA-Box-bindende Protein TBD enthält. Die TATA-Box beschreibt eine DNA-Sequenz, die sich 25-35 Basenpaare aufwärts von dem Transkriptionsstart befindet und absolut essentiell für die Promotererkennung ist. Die XPB-DNA-Helikase-Untereinheit des TFIIH-Komplexes katalysiert unter ATP-Hydrolyse die Entwindung von 11-15 Basenpaaren der DNA und bildet dadurch die Transkriptionsblase. Die einzelsträngige DNA kann nun im katalytischen Zentrum der RNA Pol II als Vorlage zur mRNA-Synthese

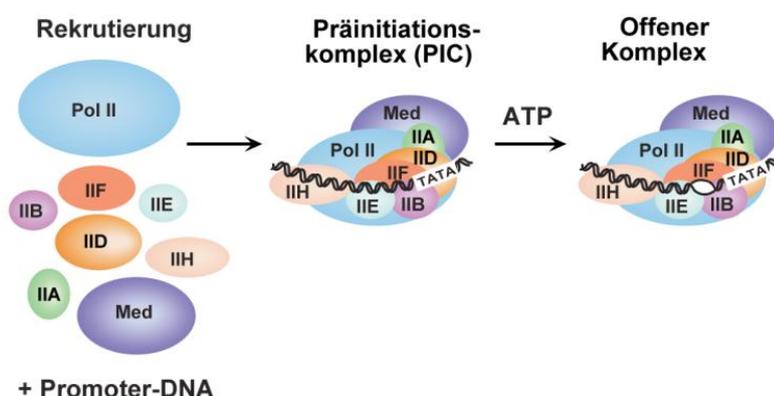


Abbildung 3: Rekrutierung der RNA Polymerase II und Assemblierung des Präinitiationskomplexes (nach Hahn, 2004).

dienen. TFIIB bildet ein Brückenelement zwischen TFIID und der RNA Pol II. Es blockiert den RNA-Ausgangskanal in der RNA Pol und stabilisiert so primäre, kurze RNA-Transkripte. Sobald diese Transkripte eine Länge von vier Nukleotiden überschreiten, muss TFIID jedoch dissoziieren (Chen and Hahn, 2004; Kostrewa et al., 2009; Pal et al., 2005). TFIIH enthält zudem die Cyclin-abhängige Kinase 7 (Cdk7) und das dazugehörige Cyclin H, welche zusammen Phosphorylierungsreaktionen an Ser5 der CTD-Heptadwiederholungen vornehmen (siehe Abschnitt 1.2.1).

Die Rekrutierung der Polymerase wird durch den Mediatorkomplex (Med, siehe Abbildung 3), weiteren Transkriptionsaktivatoren und einer Vielzahl von Remodellierungsfaktoren der Nukleosomen beeinflusst. Der Mediatorkomplex bindet an die RNA Pol II durch Erkennung der unphosphorylierten CTD (Asturias and Kornberg, 1999; Svejstrup et al., 1997; siehe Abschnitt 1.2.1).

1.1.3 Transkriptionselongation

Der Übergang von der Transkriptionsinitiation zur Transkriptionselongation wird von einer Reihe von streng kontrollierten Austauschreaktionen der beteiligten Transkriptionsfaktoren begleitet. Diese werden teilweise durch eine Veränderung des CTD-Phosphorylierungsmusters gesteuert (siehe Abschnitt 1.2.1; Buratowski, 2009; Phatnani and Greenleaf, 2006). Generell kann die Elongation in drei Phasen unterteilt werden: Promoterfreilassung, promoterproximales Pausieren und produktive Elongation. Während der Promoterfreilassung löst sich die Polymerase von der Promotersequenz

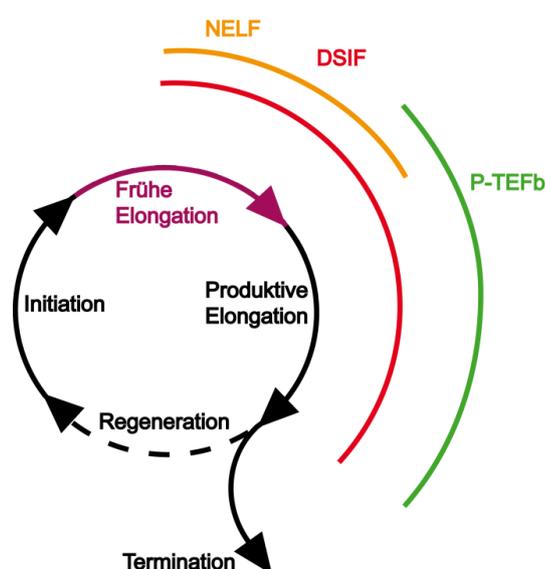


Abbildung 4: Transkriptionszyklus und zeitliche Abfolge negativer und positiver Transkriptionsfaktoren. Während der frühen Elongationsphase lagern sich die negativen Transkriptionsfaktoren DSIF und NELF an die RNA Pol II an. P-TEFb überführt den Transkriptionskomplex durch verschiedene Phosphorylierungen in die produktive Elongationsphase (nach Nechaev and Adelman, 2011).

und verstärkt die Bindung zur wachsenden RNA-Kette. Diese Stufe wird von extrinsischen Faktoren gesteuert (Dvir, 2002). Nach der Initiation wird der Transkriptionskomplex als initial transkribierender Komplex (ITC, engl.: *initially transcribing complex*) bezeichnet. Die Promoterfreilassung gilt als abgeschlossen, wenn das wachsende Transkript stabil mit dem Transkriptionskomplex assoziiert ist. Diesen Komplex bezeichnet man als frühen Elongationskomplex (EEC, engl.: *early elongation complex*). Der EEC wird weiterhin kontinuierlich verändert, bevor ein produktiver Elongationskomplex entstehen kann. Die frühe Elongationsphase ist jedoch ein langsamer und sehr ineffizienter Prozess. In dieser Phase kommt es oft zu einer Transkriptionspause, einem Arrest oder sogar zu einem Kettenabbruch (Marshall and Price, 1992). Gründe hierfür liegen sowohl in der noch nicht abgeschlossenen Konformationsänderung des Transkriptionskomplexes vom ITC zum EEC als auch in der Assoziierung von negativen Transkriptionsfaktoren wie NELF (engl.: *negative elongation factor*) und DSIF (engl.: *DRB-sensitivity inducing factor*; siehe Abschnitt 1.2.2; Chiba et al., 2010). Nach der Synthese eines etwa 20 nt-langen Oligonukleotids wird die RNA kotranskriptional am 5'-Ende modifiziert (Rasmussen and Lis, 1993). Eine Triphosphatase hydrolysiert das terminale γ -Phosphat der RNA und das mRNA-Capping-Enzym guanyliert das 5'-Ende. Anschließend methyliert die mRNA-Cap-Methyltransferase unter Verbrauch von S-Adenosylmethionin (SAM) das Guanin an Position 7. Dieses *Capping* ist eine Voraussetzung für weitere Prozessierungsschritte, den Export aus dem Nukleus und die Translation durch die Ribosomen. Zusätzlich garantiert es die Stabilität der mRNA. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass das Promoterproximale Pausieren während der frühen Elongation ein nahezu genereller Mechanismus bei eukaryotischen Genen ist und selbst einer strengen Regulation unterlegen ist (Core et al., 2008; Lee et al., 2008; Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). Damit ist das Pausieren ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt der Transkription.

Der Übergang in die produktive Elongationsphase ist schließlich mit einer Reihe von positiven Transkriptionsfaktoren assoziiert, wobei der positive Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb aufgrund seiner Kinaseaktivität auf der CTD dabei eine zentrale Rolle einnimmt (Marshall and Price, 1995; Peterlin and Price, 2006; siehe Abschnitt 1.3.1). Die inhibierende Wirkung der negativen Transkriptionsfaktoren NELF und DSIF wird durch die Aktivität von P-TEFb aufgehoben, zudem findet die Phosphorylierung der CTD an Ser2 statt. Die nun reife RNA Pol II ist außerordentlich stabil und transkribiert ohne jede weitere Dissoziation oder Unterbrechung das Gen bis zur Termination.

1.1.4 Transkriptionstermination

Während der Transkriptionstermination verlässt das primäre RNA-Transkript den Transkriptionselongationskomplex. Terminationsfaktoren und spezifische Sequenzen innerhalb der DNA-Vorlage signalisieren der RNA Pol II die Transkription zu beenden, mit der Folge dass die Polymerase anschließend von der DNA dissoziiert. Es ist bis heute nicht genau bekannt, wie die Termination in Eukaryoten verläuft. Man weiß jedoch, dass die Synthese einer RNA-Sequenz, die eine Schnittstelle und die Polyadenylierung spezifiziert, eine Voraussetzung für die Beendigung der Transkription ist. Etwa 10-30 Nukleotide vor der Schnitt- und Polyadenylierungsstelle im RNA-Transkript befindet sich oft das Hexanukleotid AAUAAA. Diese Sequenz ist für die Polyadenylierung essentiell, die von der poly(A)-Polymerase durchgeführt wird (Coin et al., 1998). Die Termination der Transkription ist mit dem Prozess der Polyadenylierung der mRNA eng verknüpft. Der Proteinkomplex CPSF (engl.: *cleavage and polyadenylation specificity factor*) bindet an die transkribierende RNA Pol II, während CstF (engl.: *cleavage stimulatory factor*) die an Ser2 phosphorylierte CTD erkennt (besprochen in Kuehner et al., 2011). Nach Synthese der AAUAAA-Sequenz wird diese von CPSF gebunden und induziert ein Pausieren der RNA Pol II. CstF bindet anschließend ein GU-reiches Signal strangabwärts. CPSF interagiert nun mit CstF, verlässt die RNA Pol II und schneidet die prä-mRNA. Derzeit gibt es zwei Modelle, die den Verlauf von Pausieren zu Termination erklären: nach dem Torpedo-Modell führt das Schneiden der mRNA vor der Polyadenylierung zu einem Transkript ohne 5'-Cap, welches die Degradation durch die Exonuklease Xrn2 ermöglicht. Dieser Prozess führt zur Dissoziation der Polymerase und zur Termination (Kim et al., 2009; West et al., 2004). Das allosterische Modell besagt, dass das Polyadenylierungssignal eine allosterische Konformationsänderung in der RNA Pol II bewirkt, wodurch die Prozessivität der Polymerase eingeschränkt ist (Luo and Bentley, 2004).

1.2 Regulation der Transkriptionselongation

1.2.1 Modifikationen der CTD

Die CTD wird während der Transkription auf vielfältige Weise intensiv modifiziert (siehe Abbildung 5). Sie stellt eine Plattform für Transkriptionsfaktoren dar, die die spezifischen Modifikationen einzeln oder in Kombination erkennen und daran binden. Die beteiligten modifizierenden Enzyme sind Kinasen, Phosphatasen, O-Glykosyltransferasen, Deglykosylasen und Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen (Egloff and Murphy, 2008). Die

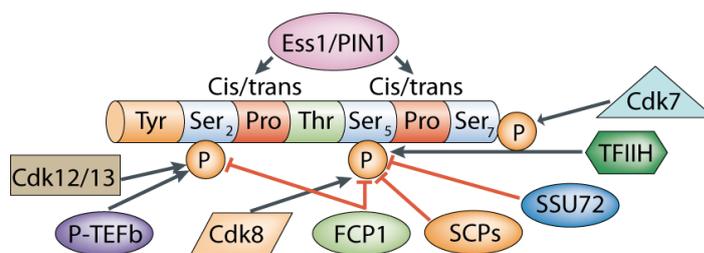


Abbildung 5: Modifikationen der CTD. Die CTD wird durch Phosphorylierungen, Glykosylierungen und Isomerisierungen im Laufe der Transkription intensiv modifiziert. Bisher sind die Phosphorylierungsreaktionen an Ser2, Ser5 und Ser7 am besten verstanden (nach Saunders et al., 2006).

Phosphorylierungen sind bisher die am besten charakterisierten Modifikationen (siehe Abbildung 6). Die hypophosphorylierte Form der CTD ist üblicherweise mit dem Präinitiationskomplex assoziiert (Phatnani and Greenleaf, 2006), während die stark modifizierte hyperphosphorylierte Form während des Elongationsprozesses zu finden ist. Die CTD wird somit im Verlaufe des Transkriptionszyklus phosphoryliert. Obwohl fünf von sieben Resten innerhalb der Heptapeptidwiederholungen phosphoryliert werden könnten (Y_1, S_2, T_4, S_5, S_7), ereignen sich die Phosphorylierungen hauptsächlich an den Serin-Positionen. Zu Beginn der Transkriptionsinitiation interagiert der Mediatorkomplex mit der unphosphorylierten CTD und begünstigt die Bildung des PICs (Asturias et al., 1999; Svejstrup et al., 1997). Zwei Cdk/Cyclin-Paare sind nun für die Phosphorylierung an Ser5 verantwortlich: Cdk7/Cyclin H sind Teil des Transkriptionsfaktors TFIIH und Cdk8/Cyclin C sind eine Untereinheit des Mediatorkomplexes (Coin and Egly, 1998; Hengartner et al., 1998). Die Ser5-Phosphorylierung ist ein Signal für die Einleitung der frühen Elongation. Kürzlich wurde zudem die Phosphorylierung an Ser7 durch das Cdk7-Homolog Kin28 in Hefen beschrieben (Akhtar et al., 2009; Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). Möglicherweise bewirkt diese Markierung eine Rekrutierung des Integratorkomplexes, der für die Biogenese einiger snRNAs essentiell ist. Die genaue Funktion der Ser7-Phosphorylierung ist bisher allerdings noch nicht geklärt. Der Übergang aus dem Transkriptionsarrest in die produktive Elongation erfolgt durch die Phosphorylierung an Ser2 der CTD durch den positiven Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb, der aus den Untereinheiten Cdk9 und Cyclin T1/2 besteht. Ser5 wird derweil durch die Phosphatase Scp 1 dephosphoryliert. Eine Phosphorylierung an Ser2 durch P-TEFb kann nur erfolgen, wenn Ser5 im selben Heptapeptid nicht phosphoryliert ist (Czudnochowski, 2009). Es wurde kürzlich eine weitere Ser2-phosphorylierende Kinase entdeckt. Cyclin K wurde ursprünglich als Cdk9-interagierendes Cyclin beschrieben, wahrscheinlich handelt es sich hierbei jedoch um das Cdk12- bzw. Cdk13-zugehörige Cyclin (Bartkowiak et al., 2010). Cdk12/Cyclin K und Cdk13/Cyclin K phosphorylieren die CTD jedoch nicht zeitgleich zu P-TEFb, sondern erst im späteren Verlauf der Transkriptionselongation. Sowohl Ser2 als auch Ser7 werden am Ende des

Transkriptionszyklus dephosphoryliert, Ser2 durch Fcp1 und Ser7 durch eine bisher nicht identifizierte Phosphatase. Die RNA Pol II befindet sich nun in einem Pool freier RNA Polymerasen. Diese sind an ihrer CTD wahlweise unmodifiziert oder glykosyliert und damit für neue Transkriptionsrunden bereit. Phosphorylierte Polymerasen innerhalb dieses Pools können nicht für weitere Transkriptionsrunden genutzt werden. Ein Schema über den Phosphorylierungszyklus der CTD während der Transkription ist nachfolgend in Abbildung 6 dargestellt.

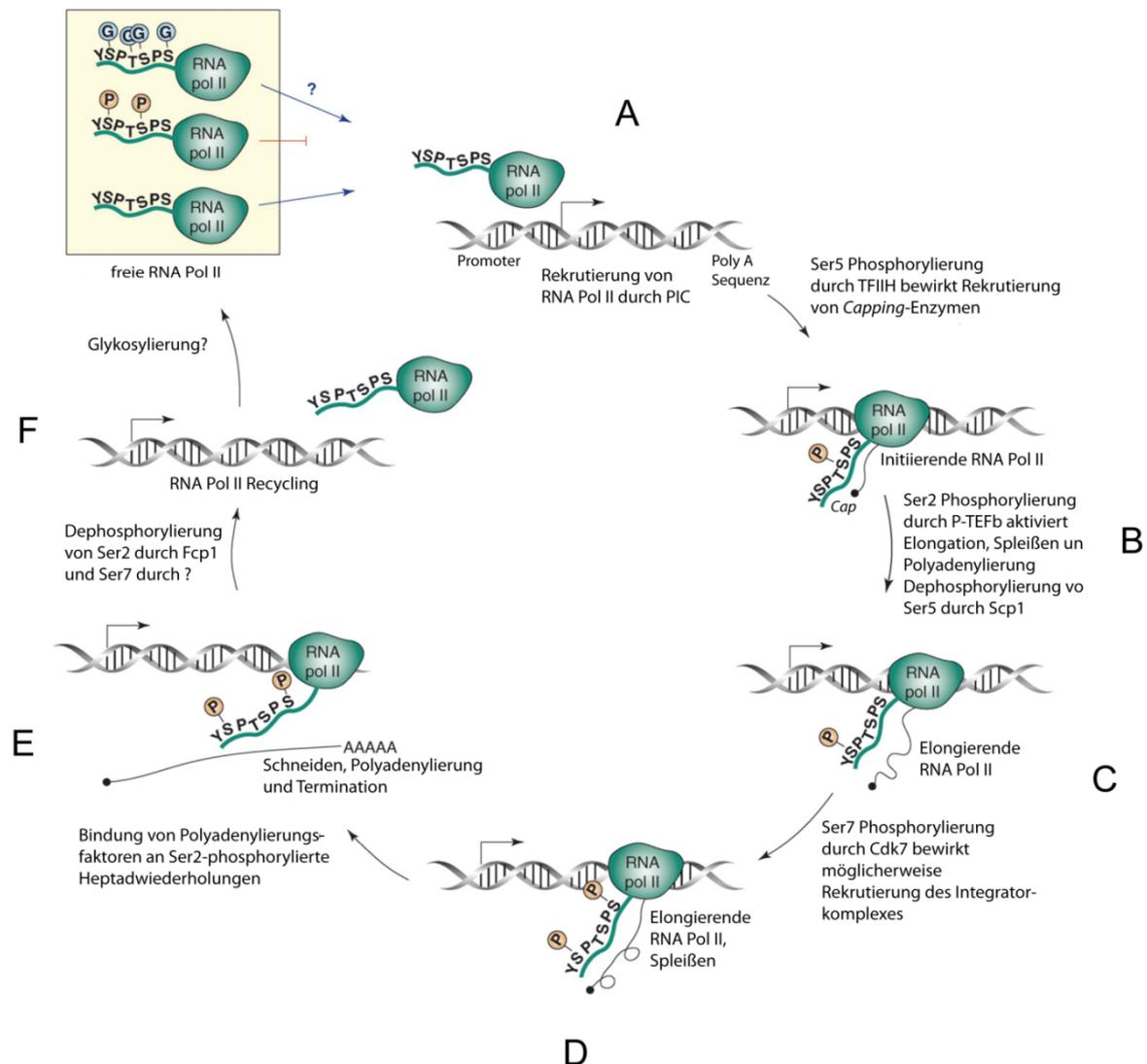


Abbildung 6: CTD-Phosphorylierungszyklus während der Transkription. (A) Zunächst wird die RNA Pol II zum PIC rekrutiert. (B) TFIIF phosphoryliert Ser5 und bewirkt die Rekrutierung von Capping-Enzymen. (C) P-TEFb phosphoryliert Ser2 und überführt den Komplex in die produktive Elongation. (D+E) mRNA-Prozessierung findet sowohl während, als auch nach der Transkription statt. (F) Die CTD wird nun dephosphoryliert und ist bereit für weitere Transkriptionszyklen (nach Egloff and Murphy, 2008).

1.2.2 Promoter-proximales Pausieren

Das Promoter-proximale Pausieren des Transkriptionselongationskomplexes wird u.a. durch die negativen Transkriptionsfaktoren DSIF und NELF hervorgerufen (Wada et al.,

1998; Yamaguchi et al., 1999). Dieser Kontrollpunkt ist entscheidend für die Regulation der Elongation, da eine schnelle Anpassung an die benötigte Transkriptionsrate erreicht werden kann (Chiba et al., 2010). Kürzlich wurde entdeckt, dass nicht nur einige wenige Gene diesem Kontrollpunkt unterliegen, sondern dass fast alle metazoischen Gene einen solchen Arrest aufweisen (Core et al., 2008; Lee et al., 2008; Muse et al., 2007; Rahl et al., 2010; Zeitlinger et al., 2007). Bei Versuchen die *in vivo* Transkription *in vitro* zu rekonstruieren, wurden Faktoren entdeckt, die an dem Arrest beteiligt sind. Das Nukleosidanalogon 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) ist ein Kinaseinhibitor, der die Transkriptionseelongation beeinträchtigt, nicht aber die Initiation. Dies führt zu verkürzten RNA-Transkripten durch vorzeitigen Kettenabbruch. DSIF und NELF sind notwendig, um *in vitro* eine DRB-sensitive Transkription zu rekonstruieren (Price, 2000). Es wurde deutlich, dass DRB den Faktor inhibiert, der die Repression durch DSIF und NELF aufhebt. Nach der Transkriptionsinitiation binden NELF und DSIF an die RNA Pol II, deren CTD an Ser5 bereits phosphoryliert ist. DSIF besteht aus den beiden Untereinheiten Spt4 und Spt5, NELF aus den Untereinheiten A, B, C/D und E. P-TEFb kann die negative Wirkung der beiden Faktoren durch Phosphorylierung von Spt5 und der NELF-E Untereinheit aufheben. Phosphoryliertes NELF verlässt den Transkriptionskomplex, während DSIF durch die Phosphorylierung in einen Transkriptionsaktivator umgewandelt wird und mit der Polymerase assoziiert bleibt (Yamada et al., 2006). DSIF rekrutiert nun den Paf1 Komplex und Tat-SF1 zum Elongationskomplex, die beide Faktoren sind, die die produktive Elongationsphase begünstigen (Chen et al., 2009).

Es wurde vor kurzem postuliert, dass das Pausieren die Assemblierung von RNA-Prozessierungsfaktoren erlaubt und somit die Verknüpfung von Transkription und prä-mRNA-Prozessierung einleitet (Glover-Cutter et al., 2008; Moore and Proudfoot, 2009). *Capping*-Enzyme können DSIF und Ser5 phosphorylierte RNA Pol II binden und das mRNA-*Capping* stimulieren (Mandal et al., 2004; McCracken et al., 1997a; McCracken et al., 1997b; Wen and Shatkin, 1999). Ser2-Phosphorylierung durch P-TEFb führt zudem zur Rekrutierung von Spleißfaktoren und Prozessierungsfaktoren des 3'-Endes (Ahn et al., 2004; Komarnitsky et al., 2000; Ni et al., 2004). In embryonalen Stammzellen bewirkt der Transkriptionsfaktor c-Myc/Max die Rekrutierung von P-TEFb zu pausierten Elongationskomplexen an nahezu einem Drittel aller aktiv transkribierter Gene (Rahl et al., 2010). Bei diesen Genen handelt es sich meist um solche, die in der Zellproliferation involviert sind. Durch die Rekrutierung von P-TEFb an die RNA Pol II kann der Übergang in die produktive Elongation effizient initiiert werden (siehe Abbildung 7; siehe Abschnitte 1.3-1.4).

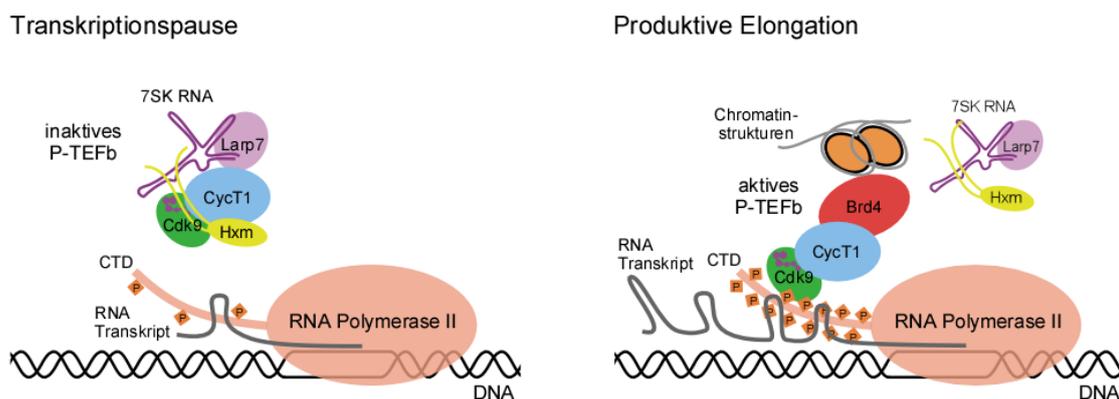


Abbildung 7: P-TEFb bewirkt den Übergang in die produktive Elongationsphase durch Phosphorylierung der CTD. P-TEFb ist zunächst im 7SK snRNP durch Interaktion mit Hexim1 und 7SK snRNA inaktiviert (siehe Abschnitt 1.4). Larp7 stabilisiert die RNA-Struktur und ist auch Teil des inhibierten P-TEFb-Komplexes. Stimulierende Signale bewirken die Dissoziation von 7SK, Hexim1 und Larp7. Das Bromodomänen-enhaltende Protein Brd4 aktiviert durch einen bisher unbekanntem Mechanismus die Kinase und rekrutiert diese zum EEC. Die CTD der RNA Pol II wird daraufhin an der Ser2-Position hyperphosphoryliert.

1.3 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen

Der eukaryotische Zellzyklus wird durch Regulierung der DNA-Replikation und der Mitose streng kontrolliert (besprochen in Echalié et al., 2010). Dafür ist hauptsächlich eine Gruppe von heterodimeren Proteinkinasen verantwortlich, die aus der regulatorischen Untereinheit Cyclin und der katalytischen Untereinheit Cdk (engl.: *Cyclin dependent kinase*) bestehen. Durch spezifische Phosphorylierung regulieren sie die Aktivität vieler Proteine, die in der DNA-Replikation und der Mitose involviert sind. Die Phosphorylierung kann sowohl von aktivierender als auch inhibitorischer Art sein. Cdk/Cyclin-Paare sind neben der Zellzyklusregulation jedoch noch an anderen zellulären Prozessen wie der Zelldifferenzierung, der Transkriptionsregulation und der Apoptose beteiligt.

Die zelluläre Konzentration an Cyclinen variiert normalerweise mit dem Fortschreiten des Zellzyklus. Dies bedeutet, dass sie bei Bedarf synthetisiert und nach Gebrauch zügig degradiert werden können (King et al., 1996). Durch Modifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinylierung wird der Abbau der Cycline streng kontrolliert (Morgan, 1995). Cycline beinhalten zwei Cyclinboxen, wobei die erste Cyclinbox, welche für die Bindung an das Cdk verantwortlich ist, hochkonserviert ist (Andersen et al., 1997). Die zweite Cyclinbox weist trotz erheblicher Sequenzunterschiede eine hohe strukturelle Homologie auf (Anand et al., 2007; Andersen et al., 1996; Hoepfner et al., 2005; Honda et al., 2005; Russo et al., 1996a).

Die Bindung des spezifischen Cyclins an eine Cdk ist für die Aktivierung der Kinase essentiell (de Falco and Giordano, 1998). Cdks sind hochkonservierte prolingerichtete

Ser/Thr-Kinasen, ihre bevorzugte Phosphorylierungssequenz ist somit (S/T)-P (Zhu et al., 2005). Diese Präferenz resultiert aus der Ausbildung einer hydrophoben Tasche nahe des aktiven Zentrums, welche das Prolin beherbergen kann. Im Gegensatz zu den Zellzyklus-Cdks gibt es bei den Transkriptions-regulierenden Cdks keine Präferenz für basische Aminosäuren an der P+3 Position (Echalier et al., 2010).

1.3.1 P-TEFb

Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb) wurde in Zusammenhang mit der HIV-stimulierten Transkriptionsaktivierung entdeckt (Wei et al., 1998). Hier dient P-TEFb als zellulärer Kofaktor für das Transaktivatorprotein Tat, welches die Transkription viraler Gene stimuliert (siehe Abschnitt 1.5.1). In diesem Kontext wurde zuerst die transkriptionsstimulierende Bedeutung P-TEFbs deutlich. Das ubiquitär exprimierte, Zellzyklus-unabhängige, humane P-TEFb ist ein Cdk/Cyclin-Paar (siehe Abbildung 8), bestehend aus Cdk9 und Cyclin T1, Cyclin T2a oder Cyclin T2b (Peng et al., 1998a; Price, 2000). Cyclin T2a und Cyclin T2b sind Produkte alternativen Spleißens und unterscheiden sich nur in ihrer C-terminalen Sequenz um 87 Aminosäuren (Peng et al., 1998b). Etwa 80% des aktiven P-TEFb Komplexes enthalten neben der Kinase Cyclin T1, jeweils 10% die Cyclin Isoform T2a bzw. T2b. P-TEFb phosphoryliert Ser2 der CTD, sowie Spt5 von DSIF und NELF-E (Fujinaga et al., 2004; Kim and Sharp, 2001) und stimuliert damit die produktive Elongation. Bei Zugabe des spezifischen Cdk-Inhibitors Flavopiridol wird die Transkriptionsleistung der RNA Pol II um 70% reduziert, wodurch die stimulierende Bedeutung von P-TEFb deutlich wird (Chao et al., 2000).

Erst im Jahr 2001 wurde entdeckt, dass P-TEFb selbst auch reguliert wird und neben der aktiven Form noch in einer inaktiven Form existiert. Der inaktive Komplex besteht neben dem Cdk/Cyclin-Paar aus einem Hexim1-Dimer (engl.: *hexamethylene bisacetamide inducible protein 1*), der kleinen nukleären RNA 7SK und dem RNA-stabilisierenden Protein Larp7 (engl.: *La-related protein 7*; siehe Abschnitte 1.4.1-1.4.4; siehe Abbildung 7; Czudnochowski et al., 2010; He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008; Michels et al., 2003; Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001; Yik et al., 2003). Als Antagonist zu Hexim1/7SK/Larp7 existiert ein P-TEFb stimulierendes Protein, das Bromodomänen-enthaltende Protein Brd4 (siehe Abschnitt 1.4.5; Jang et al., 2005; Yang et al., 2005).

Vorläufer des Cdk9/Cyclin T1 Komplexes sind zwei Chaperon-assoziierte Komplexe. Zunächst bindet Hsp70 an Cdk9, um diese zu stabilisieren und zur korrekten Faltung zu verhelfen. Anschließend wird Cdk9 zum Kinase-spezifischen Chaperonkomplex Hsp90/Cdc37 geführt, der die Assoziation mit Cyclin T1 ermöglicht (O'Keeffe et al., 2000). Kristallstrukturen von Cyclin T1 (Anand et al., 2007) und P-TEFb (Baumli et al.,

2008) geben Aufschluss über Funktion und Aktivierung der Kinase (siehe Abbildung 8), aber auch über generelle Unterschiede zu anderen, am Zellzyklus-beteiligten Cyclin-abhängigen Kinasen. Beide Strukturen enthalten die für die Aktivierung und Bindung hinreichenden Cyclinboxdomänen von Cyclin T1. Diese bestehen aus jeweils fünf α -Helices (H1-H5 und H1'-H5'), zusätzlich befinden sich N- und C-terminal jeweils eine weitere Helix (H_N und H_C). Die Interaktion mit Cdk9 verläuft ausschließlich über die N-terminale Cyclinbox, wobei sich im Vergleich zu andern Cdk/Cyclin-Paaren eine relativ geringe Interaktionsfläche ergibt. Cdk9 weist die typische Kinasefaltung mit einer großen N-terminalen und einer kleinen C-terminalen Domäne auf. Zwischen den Domänen befindet sich das aktive Zentrum, in dem ATP Mg^{2+} -abhängig gebunden wird. Flavopiridol und DRB inhibieren die Kinaseaktivität durch Bindung in die ATP-Bindungstasche (Baumli et al., 2010; Baumli et al., 2008).

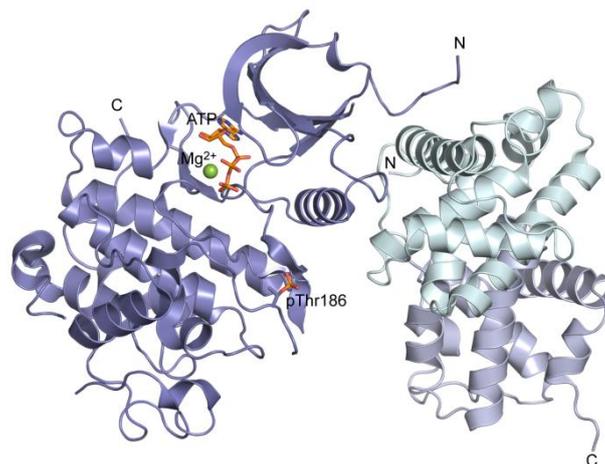


Abbildung 8: P-TEFb. In hellblau sind die Cyclinboxen von Cyclin T1 (1-259) und in dunkelblau Cdk9 (1-330) gezeigt. Das phosphorylierte Thr186 befindet sich in der T-Schleife von Cdk9. Zusätzlich sind ATP (orange) und Magnesium (grün) gebunden (pdb-Code: 3BLQ; Baumli et al., 2008).

Cyclin T1 ist ein 87 kDa-großes Protein, dessen N-terminale Cyclinboxen (1-272) für die Aktivierung und Bindung von P-TEFb ausreichend sind. Die Funktion des C-terminalen Bereichs, welcher weitere 454 Reste enthält, ist noch ungeklärt. Hier befinden sich eine vorhergesagte *coiled coil* Domäne (384-425), ein zentraler, histidinreicher Bereich (506-530), ein serinreicher Bereich (548-629) und eine C-terminale PEST-Domäne (708-725), die durch Rekrutierung von Ubiquitylierungsfaktoren für den Abbau von Cdk9 im Proteasom essentiell ist (Kiernan et al., 2001; Wei et al., 1998). Zusätzlich wird Cyclin T1 durch vielfältige posttranslationale Modifikationen verändert (Choo et al., 2010). Neben Phosphorylierungen treten auch Acetylierungen durch Histonacetyltransferasen (HATs) auf, welche die Bindung von P-TEFb an die 7SK snRNA verhindern und sich somit positiv auf die Aktivität der Kinase auswirken (Cho et al., 2009).

Cdk9 wurde erstmals 1994 als ubiquitär exprimierte Ser/Thr-Kinase mit nukleärer Lokalisation beschrieben (Garriga et al., 1996; Grana et al., 1994). Aufgrund des charakteristischen Pro-Ile-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu-Motivs wurde es zunächst in Analogie zu Cdk2 als PITALRE bezeichnet. Dieses konservierte Motiv ist für die Bindung an Cycline verantwortlich (Pavletich, 1999). Auch Cdk9 wird posttranslational durch Phosphorylierungen, Acetylierungen und Ubiquitinylierungen modifiziert (Choo et al., 2010; Cojocaru et al., 2011; Fu et al., 2007; Sabo et al., 2008). Die Phosphorylierung von Thr186 stellt die wohl wichtigste Modifikation der aktiven Kinase dar (Morgan, 1995; siehe Abbildung 8). Thr186 befindet sich in der hochkonservierten T-Schleife, die durch Phosphorylierung des Threonins eine Konformationsänderung vollzieht und damit Platz für die ATP-Bindung in der aktiven Tasche macht (siehe Abbildung 8; Russo et al., 1996b). Die Konformationsänderung wird durch die Interaktion zwischen drei konservierten Argininresten und dem Phosphothreonin herbeigeführt und stabilisiert. Zudem ist die Phosphorylierung für die Bindung an Hexim1 und 7SK essentiell (Chen et al., 2004; Li et al., 2005). *In vitro* wurde beschrieben, dass es sich hierbei um eine Autophosphorylierung handelt (Baumli et al., 2008), dies konnte jedoch *in vivo* noch nicht bestätigt werden (Ramakrishnan et al., 2009). Die Acetylierung an Lys44 führt ebenfalls zu einer Aktivierung der Kinase (Fu et al., 2007), während die Acetylierung an Lys48 im katalytischen Zentrum von Cdk9 eine Inhibition der Kinaseaktivität zur Folge hat (Sabo et al., 2008).

1.4 Negative und positive Regulation von P-TEFb

Im Zellkern liegen etwa 50% von P-TEFb in einem inaktiven Zustand vor (siehe Abbildung 7, 9). P-TEFb ist hierbei an Hexim1 oder Hexim2 und an 7SK snRNA gebunden, welche selbst wiederum mit Larp7 interagiert und somit einen fast 400 kDa-großen Komplex ausbildet. Dieser Komplex wird als das 7SK snRNP (engl.: *small nuclear ribonucleoprotein*) bezeichnet (He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008; Michels et al., 2003; Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001; Yik et al., 2003). Die regulatorischen Untereinheiten werden in Abschnitten 1.4.1 bis 1.4.5 im Einzelnen näher beschrieben. Zellstress-Bedingungen wie UV-Licht, Zugabe von DRB oder Actinomycin D, sowie kardiale Hypertrophie-Signale führen zur Disassemblierung des inhibierten Komplexes und bewirken damit die Freilassung des aktiven P-TEFb-Komplexes, welches von dem aktivierenden Protein Brd4 zum Promoter rekrutiert wird.

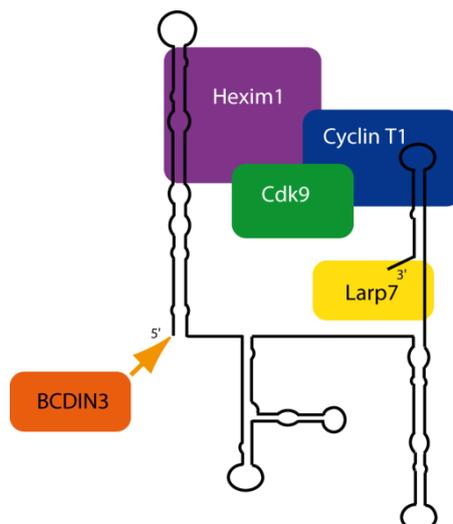


Abbildung 9: Zusammensetzung des inaktivierten P-TEFb-Komplexes. Larp7 bindet das 3'-Ende der 7SK snRNA und BCDIN3 fügt an dem 5'-Ende eine Monomethylgruppe am γ -Phosphat an. Dadurch stabilisieren sie die 7SK und schützen sie vor Degradation durch Exonukleasen. Hexim1 befindet sich als Dimer in dem Komplex und trägt entscheidend zur Inhibition von P-TEFb bei (nach Lebars et al., 2010).

Derzeit gibt es zwei Vorschläge zur Stöchiometrie des inaktiven P-TEFb-Komplexes. Zum einen wurde postuliert, dass an den Larp7/7SK-Komplex aufgrund des Migrationsverhaltens im nativen Gel ein Hexim-Dimer und jeweils zwei P-TEFb-Monomere gebunden sind (Krueger et al., 2008; Li et al., 2005). Dagegen sprechen jüngste Forschungsergebnisse, welche auf biochemischen und biophysikalischen Analysen beruhen (Dames et al., 2007; Schonichen et al., 2010). Diese Studien beschreiben nur ein P-TEFb-Molekül in dem 7SK snRNP. Strukturelle Untersuchungen des vollständigen Komplexes könnten über die Stöchiometrie der Zusammensetzung Aufschluss darüber geben.

1.4.1 Hexim1

Hexim1, das auch als MAQ1 (franz.: *ménage à quatre 1*) oder Clp1 (engl.: *cardiac lineage protein 1*) bezeichnet wird, ist ein 359 Aminosäuren-langes Protein, welches in der Zelle als Dimer vorliegt. Es wurde entdeckt, da es in Zellen, die mit Hexamethylen-Bisacetamid behandelt wurden, hochreguliert werden kann. Dies bewirkt einen Wachstumsarrest bei dem die NF- κ B abhängige Genexpression unterdrückt wird (Ouchida et al., 2003). Hexim1 befindet sich sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma, wobei es in beiden Fällen generell mit RNA assoziiert ist (Li et al., 2007).

N-terminal befindet sich eine in ihrer Länge variable Region, die zwischen Hexim-Proteinen verschiedener Arten wenig konserviert ist (siehe Abbildung 17). Eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS, 150-177) dient zugleich als Bindungsstelle für den Glukokortikoidrezeptor NR3C1 (Shimizu et al., 2005), als auch für die 7SK snRNA

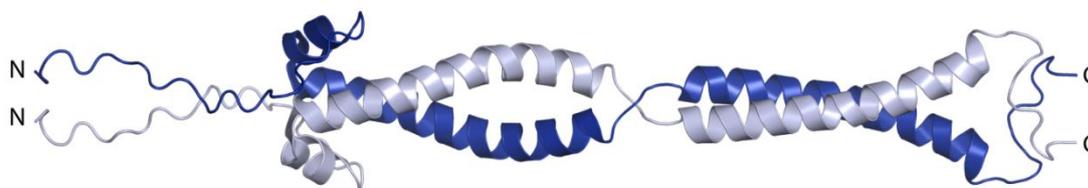


Abbildung 10: NMR-Struktur von Hexim1 TBD (255-359). Die 20 N-terminalen und 10 C-terminalen Reste dieses Hexim1-Konstruktes sind flexibel, während die zentrale *coiled coil*-Sequenz eine stabile Faltung einnimmt und zu einer elongierten Form der Proteindomänen führt. Die Unterbrechung durch einen *stammer* führt zu einer Unterteilung der *coiled coil*-Region in zwei Abschnitte (pdb-Code: 2GD7; Dames et al., 2007).

(Barboric et al., 2005; Yik et al., 2004). Ein KHRR-Motiv ist hier ausschlaggebend für die Assoziation mit der 7SK (Michels et al., 2004). Ebenso wurde die Bindung an den nukleären Transportrezeptor Importin α beschrieben, wodurch nicht nur Hexim1, sondern auch Cyclin T1 in den Nukleus transloziert werden könnten (Czudnochowski et al., 2010). In Abwesenheit von RNA bindet die basische Sequenz (150-177) intramolekular an eine saure Region (210-250) innerhalb von Hexim1 und bildet damit ein mögliches autoinhibitorisches Element (Barboric et al., 2005).

C-terminal in Hexim1 befindet sich die Cyclin T-bindende Domäne (TBD, engl.: *Cyclin T-binding domain*; Schulte et al., 2005). Sie umfasst die Reste 255-359 und ist zugleich die Dimerisierungsdomäne. Für die Bindung an Cyclin T1 sind die Aminosäuren 255-316 notwendig und hinreichend. Durch einen Leucin-*Zipper* bildet die TBD eine parallele *coiled coil*-Struktur aus, die von einem *stammer* unterbrochen ist (Dames et al., 2007). Das *coiled coil* bildet eine linksdrehende Superhelix mit einer Länge von ca. 95 Å und einem Durchmesser von etwa 20 Å (siehe Abbildung 10). Linksdrehende, dimere, parallele *coiled coils* sind durch Heptad-Wiederholungen (**a-b-c-d-e-f-g** in Strang 1 und **a'-b'-c'-d'-e'-f'-g'** in Strang 2) charakterisiert (Mason and Arndt, 2004). Positionen **a** sind üblicherweise von unpolaren β -verzweigten Aminosäuren wie beispielsweise Valin oder Isoleucin besetzt, die an den Kontaktstellen der Helices hydrophobe Wechselwirkungen ausüben und über die Stöchiometrie und Orientierung der Ketten zueinander entscheiden. Positionen **d** werden typischerweise von Leucinen eingenommen. Die Reste an Positionen **a** und **d** gehen eine für *coiled coils* typische Konformation ein, die als *Knobs-into-holes* bezeichnet wird (Lupas and Gruber, 2005). Dies bedeutet, dass die Reste an Positionen **d'**_{i-1}, **g'**_{i-1}, **a'**_i und **d'**_i in Strang 2 eine Art hydrophobe Tasche bilden, in welcher der Rest an Position **a**_i von Strang 1 positioniert werden kann. Dementsprechend werden Reste an Position **d**_i in Strang 1 von den Resten an Positionen **a'**_i, **d'**_i, **e'**_i und **a'**_{i+1} in Strang 2 eingefasst. Durch diese wechselseitigen Interaktionen wird die Struktur im hohen Maße stabilisiert. Im Gegensatz dazu sind an den Positionen **e** und **g** polare, der Lösung ausgesetzte, Aminosäuren (oft

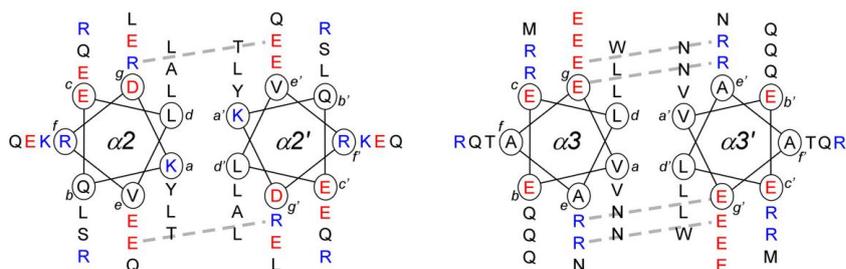


Abbildung 11: Darstellung der Heptadwiederholungen der Hexim1-TBD mit den Positionen a bis g. Salzbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Positiv geladene Aminosäuren sind in blau, negativ geladene Aminosäuren sind in rot zu sehen (links: Reste 284-311; rechts: 319-348; Dames et al., 2007).

Glutamat und Lysin) zu finden, die intermolekulare, ionische Wechselwirkungen zwischen den beiden Hexim1-Strängen eingehen können (siehe Abbildung 11). Durch alternierende Ladungsvorzeichen wird zudem die Spezifität der Heptad-Periodizität gesichert. Aminosäuren der Position g_i interagieren dabei mit Aminosäuren der Position e'_{i+1} der gegenüberliegenden Helix. Ebenso finden Interaktionen der Positionen e_i mit Positionen g'_{i-1} statt. Die übrigen Positionen b , c und f werden typischerweise von hydrophilen Aminosäuren eingenommen, welche auf der Oberfläche des Dimers positioniert sind.

Als einen *stammer* (dt.: stottern) bezeichnet man die Insertion von drei Aminosäuren in die kanonischen Heptadwiederholungen. Diese Insertion führt zu einer Überdrehung der Superhelix. In der Hexim1-TBD befindet sich der *stammer* in der zentralen *coiled coil*-Region und teilt damit die TBD in zwei etwa gleichlange Segmente (Lys284-Lys313 und Asp319-Gln348; Dames et al., 2007). Der *coiled coil*-Region ist außerdem eine kleine α -Helix vorgelagert (Thr276-Asn281), die sich jeweils an das erste Segment des gegenüberliegenden Helix-Stranges anlagert. Die N- und C-terminalen Aminosäuren (Met255-Thr276 und Gln348-Asp359) scheinen unterdessen flexibel zu sein. Die Unterbrechung des *coiled coils* durch die Einführung des *stammers* trägt zur Flexibilität der Hexim1 TBD bei.

Die Art der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 ist bis heute nicht genau geklärt. Für eine vollständige Inhibition ist zusätzlich noch die Anwesenheit von 7SK notwendig, allerdings hat auch Hexim1 allein einen inhibitorischen Effekt (Czudnochowski, 2009). Die TBD vermittelt zwar die Bindung an Cylin T1 und ist auch für die Inhibition der Kinase notwendig, allerdings nicht hinreichend. Auch dem Gegenstück zur TBD, den N-terminalen 254 Resten, konnte allein keine inhibitorische Wirkung zugesprochen werden. Es wurde angenommen, dass Hexim1 ähnlich zu den Kip-Inhibitoren wirken könnte (Michels et al., 2004; Schulte et al., 2005). $p27^{Kip}$ ist ein Inhibitor des Cdk2/Cyclin A-Komplexes. Über ein RXL-Motiv bindet es an die Cyclin-Untereinheit und positioniert dabei ein konserviertes Tyrosin in die ATP-Bindetasche der Cdk (Pavletich, 1999). N-terminal der Hexim1 TBD, welche die Rolle des RXL-Motivs durch Bindung an Cyclin T1

einnimmt, befinden sich mehrere Tyrosine, die für die Inhibition verantwortlich sein könnten. Inhibitionsstudien haben ergeben, dass in der Tat ein hochkonserviertes PYNT-Motiv (202-205; Michels et al., 2004) an der Kinaseinhibition beteiligt ist (Czudnochowski, 2009). Um jedoch den genauen Wirkungsmechanismus aufzuklären, sind strukturelle Daten des ternären Komplexes notwendig.

1.4.2 7SK snRNA

Die 7SK snRNA ist eine ubiquitär vorkommende und evolutionär hochkonservierte kleine nukleäre RNA, die aus 332 Nukleotiden besteht (Wassarman and Steitz, 1991). Diese RNA wird von der RNA Pol III transkribiert und ist die am häufigsten vorkommende snRNA in menschlichen Zellen (Zieve and Penman, 1976). Eine 7SK-Depletion durch siRNA (engl.: *small interfering RNA*) führt zur Apoptose (Haaland et al., 2005), welches die Bedeutung der 7SK snRNA unterstreicht.

7SK allein ist nicht zur Inhibition von P-TEFb fähig. Gegenwärtig wird angenommen, dass sie gewissermaßen als Gerüstmolekül die Bindung von Hexim1 an P-TEFb fördert, indem sie den autoinhibierten Zustand von Hexim1 aufhebt (siehe Abschnitt 1.4.1). Schon 1991 wurde ein erster Vorschlag zur strukturellen Anordnung dieser snRNA gegeben (Wassarman and Steitz, 1991). Demnach bildet die 7SK vier Haarnadelschleifen aus, wobei die 5'- und 3'-Schleife ausreichend für die P-TEFb-Inhibition sind. Die Bindung von Hexim1 erfolgt ausschließlich über die 5'-Haarnadelschleife an den Nukleotiden 24-48 und 60-87 (Belanger et al., 2009; Czudnochowski et al., 2010; Egloff et al., 2006). Die Studie von Egloff et al. belegt zudem, dass P-TEFb in Anwesenheit von Hexim1 die 3'-Haarnadelschleife an den Nukleotiden 302-324 bindet. Kürzlich wurde weiterhin entdeckt, dass ein evolutionär hochkonserviertes GAUC-Motiv innerhalb der 5'-Haarnadel für die spezifische Erkennung von Hexim1 zuständig ist (Lebars et al., 2010). Es ist denkbar, dass sowohl Hexim1 als auch 7SK bei der Bindung aneinander weitreichenden Konformationsänderungen unterlegen sind.

Das 3'-Ende der 7SK enthält eine Polyuridin-Sequenz über welche die Interaktion mit Larp7 vermittelt wird (siehe Abschnitt 1.4.3). Dem 5'-Ende wird von der kürzlich entdeckten Methyltransferase BCDIN3 eine Monomethylgruppe unter Verwendung des Kofaktors SAM an das γ -Phosphat hinzugefügt (Jeronimo et al., 2007). Sowohl die Larp7-Bindung als auch die Modifikation von 7SK durch BCDIN3 schützen die RNA vor Degradation.

Bei Aktivierung der Kinase dissoziiert der inaktive P-TEFb-Komplex. Nun liegt die RNA jedoch nicht frei vor, sondern wird Teil eines Komplexes, der zusätzlich die RNA Helikase A und die hnRNPs A1, A2/B1, R und Q enthält (Van Herreweghe et al., 2007).

Auch Larp7 bleibt in diesem Komplex an die 7SK gebunden (Jeronimo et al., 2007; Krueger et al., 2010). Die Dissoziation des inhibierten P-TEFb-Komplexes geht vermutlich mit einer Neuordnung der 7SK 5'-Haarnadelschleife einher (Krueger et al., 2010). Der hnRNP Komplex scheint das Level an freier nukleärer 7SK RNA zu regulieren und bietet somit eine Art Vorrat von 7SK snRNA für die Inhibition von P-TEFb an.

1.4.3 Larp7

2008 wurde in drei unabhängigen Studien Larp7 bzw. PIP7S (engl.: *P-TEFb-interaction protein for 7SK stability*) als weitere Komponente des inhibierten P-TEFb-Komplexes entdeckt (He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008). Zuvor wurde in einer proteomischen Analyse Larp7 bereits in Zusammenhang mit Cdk9 gebracht (Jeronimo et al., 2007). Die Depletion von Larp7 geht mit einer beinahe vollständigen Depletion von 7SK einher, wodurch die Relevanz von Larp7 als stabilisierender Faktor der RNA deutlich wird. Zudem kann durch einen Larp7 *knockdown* eine Zelllinie transformiert werden, da P-TEFb ohne Regulation durch 7SK die Transkription Tumor-relevanter Gene dauerhaft stimuliert (He et al., 2008).

Larp7 ist ein 582 Aminosäuren-langes Protein mit drei konservierten Domänen. Die Aminosäuren 38 bis 112 umfassen die La-Domäne bzw. das La-Motiv (LAM). Desweiteren gibt es zwei RNA-Erkennungsmotive (RRMs, engl.: *RNA recognition motif*) die sich in den Abschnitten 127-188 (RRM1) und 454-552 (RRM2) befinden (besprochen in Bayfield et al., 2010).

Die La-Domäne von Larp7 besitzt mit einer Sequenzidentität von 37% eine hohe Homologie zur entsprechenden La-Domäne von humanem La (Bousquet-Antonelli and Deragon, 2009). Es handelt sich auch hierbei um eine RNA-bindende Domäne, die in La zusammen mit der RRM1 mit Poly-Uridin-Abschnitten am 3'-Ende von ncRNAs interagiert.

Die La-Domäne hat eine für DNA- und RNA-bindende Proteine typische geflügelte-Helix-Faltung (engl.: *winged-helix*; Alfano et al., 2004; Dong et al., 2004; Kenan and Keene, 2004), während die RRM1 eine klassische $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ -Faltung einnimmt (siehe Abbildung 12; Clery et al., 2008). Gemeinsam erkennen und binden diese Domänen UUU-3'-Enden (Kotik-Kogan et al., 2008; Teplova et al., 2006). Das La-Motiv von humanem La interagiert mit den 3'-terminalen Uridinen über zahlreiche Seitenketten in der RNA-Bindungstasche. Diese Seitenketten sind in der La-Familie hochkonserviert, wodurch man auf einen ähnlichen Bindungsmechanismus für Larp7 an 7SK schließen kann (Bayfield et al., 2010). Diese Vermutung wird durch eine Studie unterstützt, in der das LAM in Larp7 durch das LAM von humanem La ersetzt wurde (He et al., 2008),

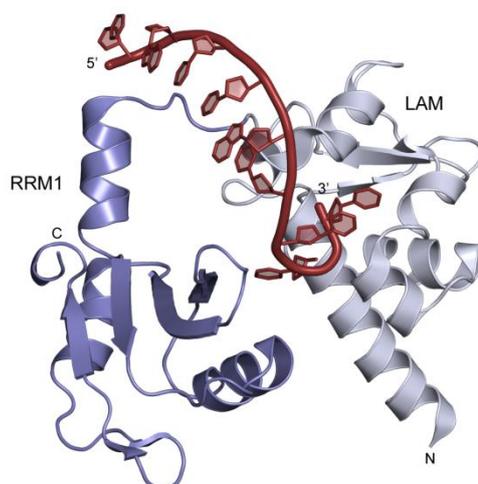


Abbildung 12: La- und RRM1-Domäne von humanem La in Komplex mit einer Poly-Uridin RNA. Das Polyuridinende wird hauptsächlich von dem La-Motiv (LAM) gebunden, wobei nur die Spezifität für U-2 gegeben ist. RRM1 unterstützt die RNA-Bindung durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung (pdb-Code: 1ZH5; Teplova et al., 2006).

wodurch die Bindung an 7SK kaum beeinträchtigt wurde. NMR-Untersuchungen haben ergeben, dass das LAM und die RRM1 in Abwesenheit von RNA keine Interaktionen eingehen und sich unabhängig voneinander, obwohl durch einen Linker verbunden, in Lösung aufhalten (Kotik-Kogan et al., 2008). Strukturelle Studien zur Interaktion von Larp7 mit 7SK sind notwendig, um die genaue Art der Interaktion zu entschlüsseln und die Stabilisierung der RNA durch Larp7 zu verstehen.

Es ist bekannt, dass etwa 2-5% der 7SK snRNA mit humanem La assoziiert ist (Chambers et al., 1983; Wassarman and Steitz, 1991). Die 5'-Methylierung durch BCDIN3 (siehe Abschnitt 1.4.4) scheint die Affinität von La an 7SK zu vermindern (Bhattacharya et al., 2002). Ein Modell, in dem La während der Transkription der 7SK an das 3'-Ende bindet und anschließend bei Assemblierung des 7SK snRNPs durch Larp7 und die enzymatische Funktion von BCDIN3 verdrängt wird, erscheint daher naheliegend.

1.4.4 BCDIN3 (MePCE)

BCDIN3 (engl.: *bicoid-interacting protein 3 homolog*) oder auch MePCE (engl.: *7SK snRNA methylphosphate capping enzyme*) genannt ist eine 689-Aminosäuren, lange S-Adenosylmethionin (SAM) abhängige Methyltransferase, die dem 5'-Ende der 7SK RNA kotranskriptional ein γ -Monomethylphosphat-Cap zur Stabilisierung hinzufügt (Jeronimo et al., 2007). Eine BCDIN3 Depletion führt zur Abnahme des zellulären 7SK-Levels um etwa 50% (Barboric et al., 2009; Xue et al., 2010). Die Aminosäuren 400-689 sind ausreichend für die enzymatische Funktion des Proteins. Es wurde beschrieben, dass BCDIN3, zusätzlich zu seiner enzymatischen Funktion, die Assemblierung des 7SK

snRNPs erleichtert (Xue et al., 2010). Sobald Larp7 an die 7SK RNA bindet, ist BCDIN3 enzymatisch inaktiv, es scheint aber die Interaktion von Larp7 und 7SK zu fördern (Xue et al., 2010). Es ist bisher ungeklärt, ob BCDIN3 ein stabiler Teil des inhibierten P-TEFb-Komplexes ist, oder ob es nach der Reaktion von dem Komplex dissoziiert (Barboric et al., 2009; Krueger et al., 2010).

1.4.5 Brd4

P-TEFb wird durch Brd4 (engl.: *bromodomain-containing protein 4*) mittels eines bisher unbekanntes Mechanismus aus dem inhibierten Komplex gelöst und in seine aktive Form überführt (siehe Abbildung 7; Bisgrove et al., 2007; Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Humanes Brd4 ist ein 1362 Aminosäuren-langes Protein, welches zur Familie der BET-Proteine (Bromodomänen und ET-Domäne) gehört. Proteine dieser Familie weisen zwei Bromodomänen (BD) und eine extraterminale Domäne (ET) auf (Dey et al., 2000). Zusätzlich befindet sich C-terminal der ET-Domäne eine SEED-Domäne mit einem hohen Anteil an Serinen, Aspartaten und Glutamaten. Der C-terminale Bereich (1315-1362) ist für die Bindung an P-TEFb verantwortlich (Bisgrove et al., 2007), wobei eine Bindung an die Cyclinboxen von Cyclin T1 ausgeschlossen werden konnte (Vollmuth, 2010). Demnach verläuft die Erkennung von Brd4 vermutlich über Cdk9 und ein Verdrängungsmechanismus der Cyclin T-bindenden Domäne von Hexim1 durch Brd4 kann ausgeschlossen werden. Die beiden Bromodomänen (BD1: 75-147, BD2: 368-440) erkennen acetylierte Lysine auf Histonen (siehe Abbildung 13; Dey et al., 2003). Diese Acetylierungen sind Marker für aktiv transkribierende Bereiche der assoziierten DNA, da acetylierte Lysine ihre positive Ladung verlieren und nicht mehr mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA interagieren. Die kondensierte DNA-Packung wird so aufgehoben. Brd4 könnte demnach P-TEFb zur Transkriptionsstelle rekrutieren, indem es über die Bromodomänen an acetylierte Lysine auf Histonen bindet und zugleich mit seinem C-terminalen Bereich mit P-TEFb interagiert.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass BD2 *in vitro* an acetyliertes Cyclin T1 bindet (Vollmuth et al., 2009). Die zwei Acetylierungsstellen Lys390 und Lys404 befinden sich C-terminal der Cyclinboxen und könnten eine Rolle bei der Regulation der Aktivierung von P-TEFb spielen (Cho et al., 2009). Die Acetylierung von Lys44 in Cdk9 geht mit einer Stimulierung der Kinaseaktivität einher (Fu et al., 2007). Möglicherweise wird auch diese Modifikation von einer der beiden Bromodomänen gebunden und verschiebt somit das Gleichgewicht zum aktiven P-TEFb-Komplex hin.

Kürzlich wurde beschrieben, dass Lysine in Histonen neben der Acetylierung auch durch Propionylierung und Butyrylierung modifiziert werden können (Chen et al., 2007; Liu et al., 2009; Zhang et al., 2009). Die Funktion dieser Modifikationen ist noch nicht

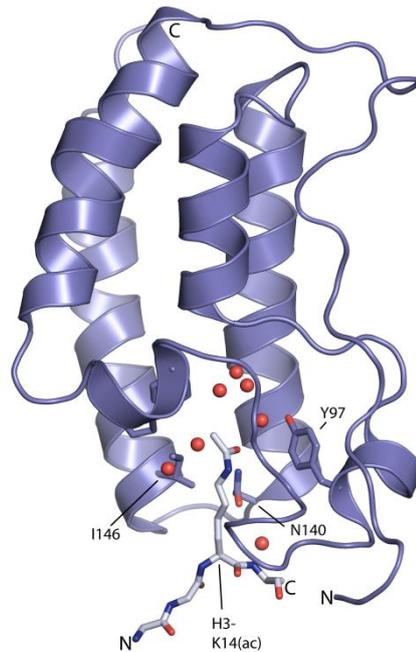


Abbildung 13: Kristallstruktur von Brd4-BD1 mit acetyliertem H3-Lys14. Hochkonservierte Seitenketten innerhalb einer hydrophoben Tasche erkennen das acetylierte Lysin zusammen mit einem sehr geordneten und hochkonservierten Wassernetzwerk (pdb-Code: 3JVK; Vollmuth et al., 2009).

geklärt, allerdings konnte gezeigt werden, dass auch butyrylierte und propionylierte Lysine von den Bromodomänen BD1 und BD2 von Brd4 *in vitro* erkannt und gebunden werden können (Vollmuth and Geyer, 2010). Ob die Lysin-Modifikationen mit den längeren Acylketten ein spezifisches Erkennungsmuster, ähnlich den mono-, di- und trimethylierten Lysinen, bildet oder aber willkürlich ist, ist noch unklar. Zudem werden Peptide mit einem Zwillingsacetylierungsmuster im Abstand von vier Resten von BD1 mit einer vergleichsweise hohen Affinität gebunden (Moriniere et al., 2009; Vollmuth and Geyer, 2010).

1.5 Fehlregulation von P-TEFb

Verschiedene Krankheitsbilder werden mit einer Fehlregulation von P-TEFb assoziiert. Zunächst wurde die Herzmuskelzellhypertrophie – eine pathologische Verdickung des Herzmuskels – mit einer Fehlregulation von P-TEFb in Zusammenhang gebracht. Die Erkrankung geht mit einem Anstieg an RNA- und Proteingehalt in der Zelle einher (Sano et al., 2002), da hypertrophe Signale eine Disassemblierung des inaktiven P-TEFb-Komplexes bewirken. Es kommt dabei zu einer unkontrollierten produktiven Transkriptionselongation, die mit erhöhtem Zellwachstum verbunden ist.

Die Bedeutung von P-TEFb während einer HIV-1 Infektion und der Tumorgenese wird in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.5.1 P-TEFb und HIV-1

Die Produktion neuer viraler Partikel in einer mit HIV-1 (engl.: *human immunodeficiency virus 1*) infizierten Zelle erfordert eine erhöhte Transkriptionsrate viraler Gene. Das HIV-Virus erreicht dies über das kleine virale Protein Tat (engl.: *transactivator of transcription*), welches einen Transkriptionsaktivator darstellt. Tat gehört zu den akzessorischen Proteinen von HIV-1, die essentiell für die virale Pathogenese *in vivo* sind. Zellen, die mit *tat⁻* Mutanten infiziert sind, produzieren kurze, virale Transkripte aus promotornahen Regionen der HIV-1 DNA (Tao and Frankel, 1992). Im Gegensatz dazu produzieren Zellen, die mit dem Wildtyp infiziert sind, vollständige virale Transkripte. In diesem Zusammenhang wurde P-TEFb im Jahre 1998 entdeckt (Wei et al., 1998) und machte die funktionale Bedeutung von P-TEFb für die Genexpression deutlich. Tat agiert als Antiterminationsfaktor, der es der RNA Pol II ermöglicht direkt in die produktive Elongationsphase überzugehen. Dieser Mechanismus ist von großem Interesse, da dies ein Ansatzpunkt zur Entwicklung von Therapien gegen HIV darstellt (Karn, 1999).

Tat ist ein sequenzspezifisches, RNA-bindendes Protein, das an eine Kopie der TAR-RNA (engl.: *transactivation response element*) bindet. Diese Sequenz befindet sich nahe des 5'-Endes des HIV-Transkriptes in den LTRs (engl.: *long terminal repeats*; Cullen, 1994). TAR bildet eine Haarnadelstruktur mit einer Ausbuchtung in der Mitte aus (Jones and Peterlin, 1994) und besitzt zwei Proteinbindungsstellen. Tat und Cyclin T1 interagieren sowohl mit TAR als auch untereinander (siehe Abbildung 14A; Anand et al., 2008; Wei et al., 1998).

Die kürzlich gelöste Kristallstruktur von P-TEFb und Tat (Tahirov et al., 2010) zeigt, dass HIV-1 Tat sowohl Interaktionen mit Cyclin T1 als auch mit Cdk9 eingeht (siehe

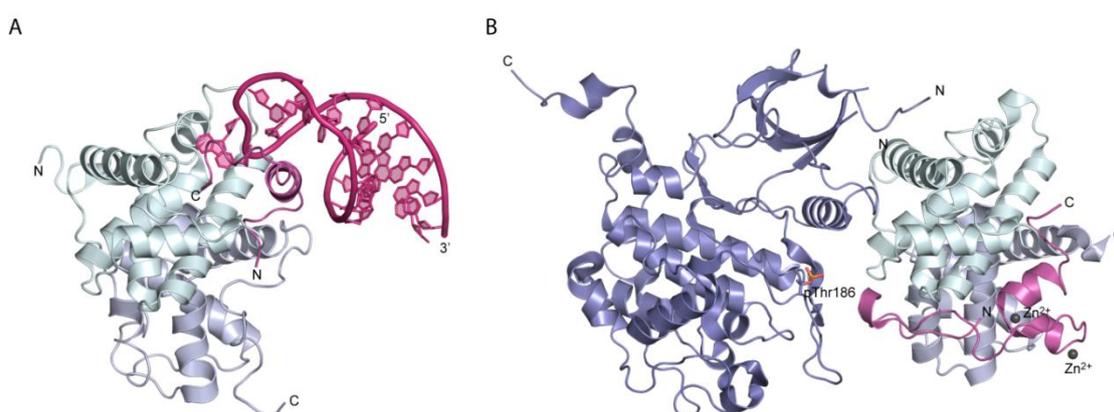


Abbildung 14: Kristallstrukturen von equinem Cyclin T1 mit EIAV-Tat und TAR (A) und humanem P-TEFb komplexiert mit HIV-1 Tat (B). Cyclin T1 ist in hellblau dargestellt, Cdk9 in blau, Tat in violett und TAR in pink. pThr186 in der Aktivierungsschleife ist gekennzeichnet und die Zinkionen, welche in der Ausbildung der Zinfinger involviert sind, sind als graue Sphären zu sehen. Tat in der equinen Struktur umfasst die Reste 41-69, in der humanen Struktur sind es die Reste 1-49 (pdb-Codes: 2W2H, 3MI9; Anand et al., 2008; Tahirov et al., 2010).

Abbildung 14B). Tat bildet dabei zwei Zinkfinger aus. Das erste Zink wird von den Seitenketten Cys22, His33, Cys34 und Cys37 in der Aktivierungsdomäne von Tat koordiniert, während das zweite Zink als intermolekularer Kontakt von Cys25, Cys27, Cys30 von Tat und Cys261 von Cyclin T1 koordiniert wird. Der zweite Zinkfinger in der beschriebene Struktur (Tahirov et al., 2010) deutet allerdings eher auf ein kristallografisches Artefakt hin, obwohl die Rolle des Cys261 in Cyclin T1 als Koordinator schon zuvor beschrieben wurde (Garber et al., 1998). Weitere strukturelle Analysen sind notwendig, um die Interaktionen zwischen P-TEFb, Tat und TAR eindeutig klären zu können.

Tat bindet die 5'-Ausbuchtung in TAR über ein Arginin-reiches Motiv (ARM, engl.: *arginine rich motif*, Karn, 1999), während Cyclin T1 die zentrale Schleife in TAR über sein basisches Tat-TAR-Erkennungsmotiv (TRM, engl.: *Tat/TAR-recognition motif*) bindet (siehe Abbildung 14; Anand et al., 2007; Anand et al., 2008; Garber et al., 1998). Die Komplexbildung führt dazu, dass Cdk9 so positioniert wird, dass, analog zur Transkription der zellulären Gene, Spt5, NELF-E und Ser2 der CTD phosphoryliert werden können (Fujinaga et al., 2004; Isel and Karn, 1999; Ivanov et al., 2000). Die darauf folgende Dissoziation von NELF und TAR ermöglicht den Übergang in die produktive Transkriptionselongationsphase. Die Tat-Synthese wird vermutlich über NF- κ B-vermittelte Aktivierung von P-TEFb induziert (Peterlin and Price, 2006).

Tat wirkt aber nicht nur als Rekrutierungsfaktor für P-TEFb, sondern erhöht auch die zu Verfügung stehende Menge an aktivem P-TEFb (Barboric et al., 2007; Sedore et al., 2007). Tat und Hexim1 binden kompetitiv an Cyclin T1 (Schulte et al., 2005), wobei Tat eine erhöhte Affinität zu Cyclin T1 aufweist und in der Lage ist, sowohl die Assemblierung des inhibierten P-TEFb-Komplexes zu verhindern, als auch die Disassemblierung schon existierender Komplexe zu stimulieren. So verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen inaktivem und aktivem P-TEFb und es können vermehrt virale Gene transkribiert werden. Kürzlich wurde beschrieben, dass Tat zunächst mit dem inaktiven P-TEFb-Komplex assoziiert und so die Kinase vor der Transkriptionsinitiation TAR-unabhängig zum HIV-1 Promoter rekrutiert (D'Orso and Frankel, 2010). Sobald die TAR-Haarnadelschleife synthetisiert wird, verdrängt diese in Kombination mit Tat die inhibitorischen Untereinheiten des 7SK snRNPs und aktiviert die Kinase durch Bindung an Tat und Cyclin T1. In einer parallel veröffentlichten Studie wurde ein ähnlicher Komplex beschrieben, bei dem allerdings Hexim1 nicht vorhanden ist (Sobhian et al., 2010). Dies würde auch mit der Beobachtung der Verdrängung von Hexim1 durch Tat einhergehen (Schulte et al., 2005). Die Autoren schlagen hier eine Bindung von Tat an 7SK analog zur TAR-Bindung vor. Dies wird durch strukturelle Studien unterstützt, in denen die Bindung der 7SK an Argininreste untersucht wurde (Durney and D'Souza,

2010). Der Komplex aus P-TEFb, 7SK, Larp7 und Tat ist im Gegensatz zu dem Hexim1-haltigen 7SK snRNP resistent gegen Behandlung mit UV-Licht, Actinomycin D oder HMBA. Daraus kann man schließen, dass Hexim1 der Stress-sensitive Faktor im 7SK snRNP ist.

Auch Tat wird *in vivo* vielfältig posttranslational modifiziert. Diese Modifikationen umfassen Acetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen und Ubiquitylierungen (Ammosova et al., 2006; Boulanger et al., 2005; Bres et al., 2003; Col et al., 2001; Ott et al., 1999; Pagans et al., 2010; Pagans et al., 2005; Van Duyne et al., 2008). Lys50 innerhalb des Arginin-reichen Motivs, welches für die Erkennung von RNA notwendig ist, wird durch p300/CBP acetyliert. Dadurch wird die Bindung an Cyclin T1 gestört (Kaehlcke et al., 2003) und dient somit als Signal für die Deaktivierung der Transkriptionsaktivierung. PCAF hingegen acetyliert Lys28 in der Tat-Aktivierungsdomäne und stimuliert damit die Cyclin T1-Tat-TAR Komplex-Assemblierung (D'Orso and Frankel, 2009; Kiernan et al., 1999). Die Phosphorylierung einzelner Serinreste in Tat wird vermutlich durch Cdk2 vermittelt und scheint ebenfalls wichtig für die HIV-1 Transkription zu sein (Ammosova et al., 2006). Die Methylierung durch Set7/9-KMT7 erfolgt an Lys51, auch innerhalb des RNA-Erkennungsmotivs (Pagans et al., 2010) und ist für die vollständige Transkriptionsaktivierung notwendig.

In HIV-infizierten Zellen ist Tat Teil des Superelongationskomplexes (SEC, engl.: *super elongation complex*) und rekrutiert die Transkriptionsfaktoren zum HIV-1 Promoter (besprochen in He and Zhou, 2011). Zusätzlich begünstigt Tat die SEC-Formierung.

1.5.2 P-TEFb und Krebs

In Brustzelltumorgewebe spielt die P-TEFb-Regulation durch Hexim1 eine entscheidende Rolle (Wittmann et al., 2005; Wittmann et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde Hexim1 als ein durch Östrogen herunterreguliertes Protein, EDG1 (engl.: *estrogen-down-regulated gene 1*) beschrieben. Eine Überproduktion an Östrogen in Brustzelltumoren bewirkt die Herunterregulation von Hexim1 und begünstigt dadurch die Zellproliferation. Dies trägt entscheidend zur Entstehung von Brustkrebs bei. Zudem ergaben Untersuchungen, dass sich das Hexim1-Gen und das in Tumoren häufig mutierte BRCA1-Gen in räumlicher Nähe auf Chromosom 17q befinden. Unterschiedliche Expressionslevels in verschiedenen Gewebearten zwischen Hexim1 und Hexim2 lassen zudem eine Rolle der Proteine in Darm-, Hoden- und Eierstockkrebs vermuten (Zhou and Yik, 2006).

Kürzlich wurde P-TEFb in Zusammenhang mit einer akuten Form der Leukämie, der *mixed lineage leukemia* gebracht (Mueller et al., 2007). Bei dieser Erkrankung ist das MLL-Gen, welches für eine Histonmethyltransferase kodiert, in chromosomalen

Translokationen involviert. Die resultierenden Fusionsproteine sind methylierungsdefizient und bilden defekte Transkriptionsfaktoren, die Gene für die hämatopoetische Entwicklung ektopisch aktivieren. Einer dieser Fusionspartner ist ENL (engl.: *eleven-nineteen leukemia*), welches unter anderem mit P-TEFb assoziiert. Der Superelongationskomplex SEC besteht grundsätzlich aus den Untereinheiten P-TEFb, ELL2, AFF4, ENL und AF9 (He et al., 2010; Lin et al., 2010; Mueller et al., 2009; Sobhian et al., 2010; Yokoyama et al., 2010). AFF4 ist eine Histonmethyltransferase und dient als zentrales Gerüst für die Komplex-Assemblierung. ELL2 ist ähnlich zu P-TEFb ein positiver Transkriptionselongationsfaktor. Weitere Komponenten, wie beispielsweise HIV-1 Tat, können hinzukommen, um die Funktion des SECs zu verändern (siehe Abschnitt 1.5.1; He and Zhou, 2011). AFF4 und AF9 sind weitere, typische Fusionspartner für MLL (Slany, 2009). Die genaue Funktion des SECs in gesunden Zellen ist bisher nicht geklärt.

Auch das Onkogen c-Myc assoziiert mit P-TEFb. Die Tumorentstehung durch Überexpression von c-Myc beruht möglicherweise auf der vermehrten Rekrutierung von P-TEFb an von c-Myc besetzte Promoterregionen (Rahl et al., 2010).

1.6 Zielsetzung

Der Übergang von der Transkriptionsinitiation zur Transkriptionselongation ist ein streng kontrollierter Prozess. P-TEFb ist ein zentraler Faktor bei der Regulation der Transkriptionselongation. Er bewirkt die Überwindung des Promoter-proximalen Pausierens und kann so den Transkriptionskomplex in die produktive Elongationsphase überführen. Eine Fehlregulation von P-TEFb führt zu schwerwiegenden Krankheitsbildern wie Herzmuskelzellhypertrophie oder akuter Leukämie. Für die negative Regulation P-TEFbs sind das Protein Hexim1 und die 7SK snRNA zuständig, welche selbst von dem RNA-stabilisierenden Protein Larp7 gebunden ist. Etwa 50% des zellulären P-TEFbs liegt in diesem inhibierten Komplex, dem 7SK snRNP, vor. Die Charakterisierung der molekularen Grundlage dieser negativen Regulation ist Gegenstand dieser Arbeit.

Hexim1 interagiert über seine Cyclin T-bindende Domäne (TBD) mit Cyclin T1, während N-terminal gelegene Reste für die Inhibition von Cdk9 verantwortlich sind. Im Speziellen handelt es sich dabei um das PYNT-Motiv (202-205), welches möglicherweise in die ATP-Bindungstasche von Cdk9 reicht. Zunächst sollte in dieser Arbeit die Interaktion der TBD mit Cyclin T1 strukturell geklärt werden. Ferner sollten

ternäre Komplexe aus P-TEFb und Hexim1 assembliert und für kristallographische Studien genutzt werden, um den Mechanismus der Inhibition zu klären.

7SK snRNA unterstützt den Grad der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1. Die RNA selbst liegt in der Zelle fast ausschließlich in Larp7-gebundener Form vor. Daher sollte die Funktion des 7SK stabilisierenden Proteins geklärt werden. Zwischen den drei RNA-bindenden Domänen befinden sich große Bereiche mit unbekannter Funktion. Biochemische Untersuchungen verschiedener Larp7 Proteinkonstrukte sollten zur Entschlüsselung dieser Bereiche verhelfen.

Ein Protokoll für die Assemblierung des vollständigen 7SK snRNPs aus Cdk9, Cyclin T1, Hexim1, 7SK snRNA und Larp7 sollte für elektronenmikroskopische Aufnahmen generiert werden. Dazu sollten rekombinante Proteine mit *in vitro* transkribierter RNA vereint werden, so dass ein stabiler Komplex entsteht. Der rekonstituierte Komplex sollte Aufschlüsse über die Stöchiometrie, als auch den Inhibitionsmechanismus liefern.

Der viral aktivierte Komplex aus Cyclin T1, HIV-1 Tat und TAR stellt einen weiteren wichtigen Ribonukleoprotein-Komplex dar. Auch hier sollte die Assemblierung optimiert werden, so dass kristallographische Untersuchungen zur Klärung der Aktivierung beitragen könnten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Studie verwendeten Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare (Freiburg), Gerbu (Gaiberg), J. T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialysemembranen	Roth (Karlsruhe)
Kristallisationsplatten 96-fach	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
	Corning Life Sciences (Lowell, USA)
Kristallisationsplatten 24-fach	MP Biomedicals (Solon, USA)
Kristallisationsscreens	Qiagen (Hilden)
	Hampton Research, (Aliso Viejo, USA)
Parafilm	Roth (Karlsruhe)
Ultrafiltrationseinheiten	Millipore Amicon (Witten)
Vivacell250 Ultrafiltrationseinheiten	Sartorius Stedim (Aubagne, Frankreich)

2.1.3 Molekularbiologische Kits

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

2.1.4 Chromatographiesäulen und –materialien

Säulenmaterial

GSH 4 Fast Flow	GE Healthcare (Freiburg)
Heparin Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare (Freiburg)
Kationenaustauscher POROS 20 HS	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Ni-NTA Superflow	Qiagen (Hilden)
Q Sepharose Fast Flow	GE Healthcare (Freiburg)
SP Sepharose Fast Flow	GE Healthcare (Freiburg)

Säulen

HiLoad Superdex 75 16/60 prep grade	GE Healthcare (Freiburg)
HiLoad Superdex 75 26/60 prep grade	GE Healthcare (Freiburg)
HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade	GE Healthcare (Freiburg)
Superdex 75 10/300	GE Healthcare (Freiburg)
Superdex 200 10/300	GE Healthcare (Freiburg)
PD10 Entsalzungssäulen	GE Healthcare (Freiburg)
VYDAC-C ₄ -Säule für ESI-MS	Grace (Deerfield, USA)

2.1.5 Größenstandards

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

2.1.6 Enzyme und Proteine

Expand High Fidelity Polymerase	Roche (Mannheim)
PreScission Protease	MPI Dortmund
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
TEV Protease	MPI Dortmund
T7 Polymerase	MPI Dortmund
Trypsin, proteomics grade	Roche (Mannheim)

2.1.7 DNA-Konstrukte

Primer	MWG Biotech (München)
<u>Vektoren</u>	
pGEX-4T1 TEV-site modifiziert	GE Healthcare (Freiburg)
pGEX-2T TEV-site modifiziert	GE Healthcare (Freiburg)
pProEX-HTa, -HTb	Invitrogen (Karlsruhe)
pET28a	Novagen (Darmstadt)
pFastBac HTb	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.8 Mikroorganismen und Zelllinien

<u>E. coli Stamm</u>	<u>Genotyp</u>
TG1	lac-pro thi-1 hsdΔ5 [F' traΔ36, proAB+, lacIQ, lacZ.M15]
BL21(DE3)	F- ompT hsdS (r _B -m _B -) dcm gal (DE3)
BL21(DE3)RIL	F- ompT hsdS (r _B -m _B -) dcm Tet _r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam _r]
BL21(DE3)RP	F- ompT hsdS (r _B -m _B -) dcm Tet _r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam _r]
DH10Bac	Fmcra Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG/bMON14272/pMON714
<u>Insektenzelllinie</u>	
Sf21	Zelllinie aus dem Eierstockgewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Vaughn et al., 1977)

2.1.9 Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie

<u>Medium und Zusätze für die eukaryotische Zellkultur</u>	
Fötales Kälberserum	Sigma (München)
Penicillin/Streptomycin Lösung 100x	Sigma (Steinheim)
Pluronic F-68	Pan-Biotech (Aidenbach)
Sf-900 TM III SFM 1x	
Insektenzellflüssigmedium	Invitrogen (Karlsruhe)
TC-100 Insektenzellmedium ohne	

Glutamin, ohne NaHCO₃

Pan-Biotech (Aidenbach)

LB-Medium

1% (w/v) Bactotrypton

0.5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) NaCl, pH 7,2

LB-Differenzierungs-Agar-Platten

LB-Medium mit

- 50 µg/ml Kanamycin
- 7 µg/ml Gentamycin
- 10 µg/ml Tetrazyklin
- 100 µg/ml X-Gal
- 40 µg/ml IPTG

Le Master Medium

pro Liter 0,5 mg Alanin, 0,58 mg Arginin HCl, 0,4 mg Aspartat, 0,033 mg L-Cystein, 0,75 mg Glutamat (Na), 0,333 mg Glutamin, 0,54 mg Glycin, 0,06 mg Histidin, 0,23 mg Isoleucin, 0,23 mg Leucin, 0,42 mg Lysin HCl, 0,133 mg Phenylalanin, 0,1 mg Prolin, 2,083 mg L-Serin, 0,23 mg Threonin, 0,17 mg Tyrosin, 0,23 mg Valin, 0,5 mg Adenin, 0,67 mg Guanosin, 0,17 mg Thymin, 0,5 mg Uracil, 1,5 mg Natriumacetat, 1,5 mg Succinat, 0,75 mg Ammoniumchlorid, 0,85 mg Natriumhydroxid, 10,5 mg K₂HPO₄ autoklavieren und die folgende Lösung sterilfiltriert dazugeben: 10 mg MgSO₄·7H₂O, 4,2 mg FeSO₄, 8 µL H₂SO₄ (liquid), 0,005 mg Thiamin
50 mg Selenomethionin: Acros Organics (Geel, Belgien)

Antibiotika

Ampicillin	100 mg/L Medium
Chloramphenicol	34 mg/L Medium
Gentamycin	7 mg/L Medium
Kanamycin	50 mg/L Medium
Tetracyclin	100 mg/L Medium

2.1.10 Geräte

Agarosegelkammer DNA-SUB-Cell	Biorad (München)
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik (Oberschleissheim)
Brutschrank Heraeus CO ₂ Auto zero	Heraeus (Hanau)
CD-Spektrometer J-815	Jasco (Gross-Umstadt)
Cryo Elektronenmikroskop CM200 FEG	Philips (Eindhoven, Niederlande)
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Biorad (München)
Elektrospraymassenspektrometer	
Finnigan LCQ Advantage MAX	Thermo Fisher Scientific (Corston, UK)
Agilent 1000	Hewlett Packard (Texas, USA)
FPLC Äkta prime	GE Healthcare (Freiburg)
Gefriergerät (-80°C) Heraeus Herafreeze	Heraeus (Hanau)
Gradientenmischer Gradient Master	BioComp Instruments Inc. (Fredericton, Kanada)
Heizschüttler eppendorf Thermomixer	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
HPLC-Systeme	
600 S Controller	Waters (Milford, USA)
626 Pumpe, 2487 Dual	Waters (Milford, USA)
Absoptionsdetektor 717plus	Waters (Milford, USA)
Autosampler und Inline Entgaser AF	Waters (Milford, USA)
Kristallisationsroboter Mosquito Crystal	Ttp Labtech (Melbourn, Hertfordshire, UK)

Kristallisationsroboter Art Robbins Phoenix	Dunn Labortechnik (Asbach)
Kühlzentrifuge eppendorf 5810 R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Magnetrührer MR 2000	Heidolph (Schwabach)
Microfluidizer M-110S	Microfluidics Corp. (Newton, UK)
Mikrokalorimeter VP-ITC	GE Healthcare (Freiburg)
Mikrokalorimeter iTC200	GE Healthcare (Freiburg)
Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss (Jena)
Nanodrop DN-1000 UV-Spektrometer	Thermo Fisher Scientific (Corston, UK)
PCR Express-Gerät	Hybaid (Franklin, USA)
Photometer eppendorf Biophotometer	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Real-Time PCR CFX96	Biorad (München)
Röntgengenerator, Detektor	Marresearch (Norderstedt)
Schüttelinkubator Multitron	Infors HAT (Bottmingen, Schweiz)
SDS-PAGE-Gelkammer Mini Protean III	Bio-Rad (München)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103H	Bandelin electronic (Berlin)
Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250	Branson (Danbury, USA)
Visualisierungs- und Inkubationseinheit Rock Imager	Formulatrix (Waltham, USA)
Vortexer Vortex Genie ²	Bender & Hobein (Bruchsal)
Voyager-DE pro MALDI Massenspektrometer	Perseptive Biosystems (Weiterstadt)
Waage Satorius BP110S	Satorius (Göttingen)
Zentrifuge Beckman Coulter Avanti J-20 XP	Beckmann (Fullerton, USA)
Zentrifuge eppendorf 5415 D	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) dient zur *in vitro* Amplifikation und Mutagenese von DNA-Konstrukten. Hierbei wird von einer DNA-Polymerase ausgehend von einem DNA-Einzelstrang und einem zu dem DNA-Einzelstrang komplementären DNA-Oligonukleotid (Primer) ein DNA-Doppelstrang synthetisiert. Es können somit je nach Wahl der Primer DNA-Fragmente verschiedener Längen erzeugt werden. Ein PCR-Zyklus kann in drei Schritte unterteilt werden. Zunächst wird die DNA stark erhitzt, um DNA-Einzelstränge zu erzeugen (Denaturierung). Im zweiten Schritt, dem Hybridisierungsschritt, senkt man die Temperatur wieder, so dass eine Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge erfolgen kann. Der letzte Schritt umfasst die Elongationsphase, bei welcher die DNA-Polymerase an den Primern beginnend die DNA-Doppelstränge vervollständigt. In den folgenden Zyklen können die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge wiederum als Matrizen dienen. Eine PCR umfasst üblicherweise 15 bis 25 Zyklen. Rückstände können anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese und einem Gelextraktionsschritt entfernt werden.

PCR Ansatz	Schritt	Temperatur	Zeit
33 μ L ddH ₂ O	Vorlauf	95°C	120 s
10 μ L 5x Polymerasepuffer	Denaturierung	95°C	15 s
4 μ L 2,5 mM dNTPs	Hybridisierung	T _m	30 s
1 μ L 200 ng/ μ L DNA-Matrize	Elongation	72°C	45-60 s
1 μ L 10 pmol/ μ L 5'-Primer	finale Elongation	72°C	7 min
1 μ L 10 pmol/ μ L 3'-Primer			
0,5 μ L 5000 U/mL Polymerase			

} 15-25x

Mit $T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl C/G}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl A/T}) - 5^\circ\text{C}$

2.2.2 Mega-Primer Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen wurde mithilfe der Mega-Primer Methode durchgeführt. Hierzu werden vorab in zwei getrennten PCR-Ansätzen zwei große Oligonukleotide (Mega-Primer) hergestellt, wobei Ersteres vom 5'-Ende bis zur Mutation und Zweiteres von der Mutation bis zum 3'-Ende reicht. Der *reverse* Primer des ersten Oligonukleotids und der *forward* Primer des zweiten Oligonukleotids beinhalten jeweils die veränderte Basensequenz. Durch die komplementären Bereiche lagern sich die Oligonukleotide in einem Hybridisierungsschritt aneinander. In einer zweiten PCR-Reaktion mit beiden Mega-Primern dienen der *forward* Primer des ersten Oligonukleotids und der *reverse* Primer des zweiten Oligonukleotids als konventionelle Primer.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese kann zur Größenbestimmung, Analyse und zur Reinigung von PCR-generierten oder mit Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragmenten genutzt werden. Die DNA ist aufgrund ihres Phosphatrückgrates negativ geladen, wodurch mit zunehmender Größe auch die negative Ladung zunimmt. Dadurch bewegen sich Fragmente unterschiedlicher Länge bei angelegter Spannung in einem Agarosegel unterschiedlich schnell und können so voneinander getrennt werden. In dieser Arbeit wurden je nach Größe des DNA-Fragments 1–1,5%-ige Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelsystemen der Firma Biorad bei einer konstanten Spannung von 110 V. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 6x Probenpuffer versetzt. Zur exakten Größenbestimmung der Fragmente wurde zudem ein 1 kbase Größenstandard (Invitrogen) aufgetragen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Laufpuffer und den Gelen konnten die DNA-Fragmente unter UV-Licht visualisiert werden.

10x TBE

108 g Tris
55 g Borsäure
3,35 g EDTA
60 μ L Ethidiumbromid
auf 1 L ddH₂O

6x Probenpuffer

10% Ficoll
0,025% Bromphenolblau
0,025% Xylencyanol
in TBE Puffer

2.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, welche doppelsträngige DNA an für sie spezifischen, meist palindromischen Sequenzen binden und schneiden. Die Methode des Restriktionsverdau wurde auch zur Klonierungskontrolle von neu generierten Plasmiden eingesetzt. Dazu wurde das geschnittene Konstrukt per Agarosegelelektrophorese auf seine Größe hin überprüft. Es wurden die vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen eingesetzt.

2.2.5 Ligation

Zwei mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnittene Nukleinsäuren können mithilfe des Enzyms Ligase kovalent verknüpft werden. Hierbei wird ein freies 3'-Hydroxy- mit einem 5'-Phosphatende verbunden. Die Reaktion wurde für mindestens 2 h bei Raumtemperatur, jedoch nicht länger als 16 h, durchgeführt.

Ansatz

8 µL ddH₂O
1 µL geschnittener Vektor
8 µL geschnittenes PCR-Fragment
2 µL 10x Ligationspuffer
1 µL T4 Ligase

2.2.6 Transformation von Bakterien

Für die Überexpression von Proteinen und zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde entsprechende DNA in *E. coli* Zellen (BL21(DE3) bzw. TG1) per Hitze- oder Elektroschock transformiert.

Hitzeschocktransformation

Für diese Art der Transformation wurden die Bakterien zuvor mit DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelt, um die Membran zu permeabilisieren und die Aufnahme der Plasmide zu ermöglichen.

0,2 g der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit ~30 ng der DNA vermischt. Die Zellen wurden auf Eis für 30 min inkubiert und anschließend für 45 s einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Selektionsmarker-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroschocktransformation

0,2 g der kompetenten Zellen wurden aufgetaut und mit ~20 ng der DNA vermengt. Eine anschließende Überführung in ein Elektroporationsküvette ermöglichte einen Elektroschock bei 1,5 V. Nach Zugabe von 800 µL LB-Medium wurde die Zellsuspension für 30 min bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde nach Zentrifugation auf Selektionsmarker-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Plasmidpräparation

Transformierte *E. coli* TG1 Zellen wurden in Antibiotikum-haltigen LB-Medium angezogen und bei 10.000 rpm für 2 min geerntet. Die Isolierung der DNA erfolgte unter Verwendung der QIAprep Spin Plasmid Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle aller in dieser Arbeit klonierten DNA-Fragmente wurden die Nukleinsäuren über das Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977) sequenziert. Für die Sequenzierungs-PCR wurden vektorspezifische Sequenzierungsprimer verwendet, die typischerweise ~100 nt vor bzw. hinter der MCS (engl.: *multiple cloning site*) ansetzen. Zudem wurde ein Terminator-Reaction Mix verwendet, welcher neben der AmpliTaq DNA Polymerase auch die vier fluoreszenzmarkierten ddNTPs enthält. Nach der PCR wurde die DNA gefällt und elektrophoretisch getrennt und detektiert (Walburga Hecker, MPI Dortmund).

PCR Ansatz		Schritt	Temperatur	Zeit	} 25x
10 µL	ddH ₂ O	Denaturierung	96°C	10 s	
2 µL	Sequenzierungspuffer	Hybridisierung	55°C	5 s	
4 µL	Terminator Reaction Mix	Elongation	60°C	240 s	
3 µL	Plasmid-DNA				
1 µL	Primer				

2.2.9 Glycerindauerkulturen

Um erneute Transformationen zu vermeiden, wurden Glycerindauerkulturen der transformierten Bakterien angelegt, welche für einen längeren Zeitraum stabil bei -80°C gelagert werden können. Hierfür wurde eine einzelne Kolonie von einer LB-Agar-Platte gepickt und in 3 mL Antibiotikum-haltigem LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 herangezogen. 1200 µL dieser Kultur wurden mit 800 µL 50% (v/v) Glycerol vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.10 In vitro Synthese von RNAs

Die in dieser Arbeit verwendeten RNA-Konstrukte wurden von Frau Karin Vogel-Bachmayr (MPI Dortmund) produziert und zur Verfügung gestellt. Die 7SK Vollängen RNA wurde unter Verwendung eines linearisierten 7SK-Plasmids und des Ambion MEGAscript T7-Kits transkribiert und gereinigt. Kürzere RNA-Konstrukte wurden unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide und im Haus gereinigter T7 Polymerase erstellt (Frau Diana Ludwig, MPI Dortmund).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression in E. coli

Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden die Expressionsstämme BL21(DE3) und BL21(DE3) R3/Rosetta verwendet. Aus einer Glycerindauerkultur wurden 100 mL LB-Medium für eine Vorkultur inokuliert, welche über Nacht bei 37°C und 150 rpm wuchs. Mit dieser Vorkultur wurden 2 Liter Antibiotikum-haltiges LB-Medium in 5L-Kolben mit einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Die Induktion mit 0,3–0,5 mM IPTG fand bei einer OD₆₀₀ von 0,8 statt. Die Expression erfolgte typischerweise bei 30°C für 4 h oder bei 20°C für 16 h. Für die Expression Selenomethionin-markierter Proteine wurden die Zellen in Le Master Medium mit Antibiotikum bei 30°C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden 50 mg/L Selenomethionin hinzugegeben und nach 15 min mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach 3 h erfolgte die Zellernte.

Nach Zentrifugation der Kulturen bei 5.000 g für 20 min wurde das Pellet in entsprechendem Lysepuffer oder PBS (engl.: *phosphate buffered saline*, 10 mM NaP_i, pH 7,2, 130 mM NaCl) resuspendiert und ein weiteres Mal bei 5.000 g für 10 min zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.2 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellen ist Voraussetzung für die Reinigung eines überexprimierten Proteins. Dazu wurden die Bakterien in Lysepuffer resuspendiert und mit Hilfe eines Mikrofluidizers aufgeschlossen. Die Bakteriensuspension wird hierbei bei einem Druck von 800 bar wiederholt durch eine enge Kapillare geführt. Dabei wird die Zellmembran zerstört, so dass die zytosolische Fraktion von dem unlöslichen Zelldebris durch Zentrifugation für 30 min bei 32.000 g und 4°C getrennt werden kann.

Insektenzellen wurden nach Resuspension in dem entsprechenden Lysepuffer (100 mL/5 g Zellen) per Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurde die Zellsuspension während der Pulse (3 Zyklen á 15 Pulse, *Output control 4, Duty cycle 90*) auf Eis gelagert. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde durch regelmäßige Überprüfung der Zellen im Lichtmikroskop kontrolliert.

2.3.3 Affinitätschromatographie

Durch Affinitätschromatographie können Proteine basierend auf spezifischen, reversiblen Interaktionen zwischen Proteinen und der Chromatographiematrix voneinander getrennt werden. Diese nicht-kovalenten Wechselwirkungen können sowohl elektrostatisch als auch hydrophob sein, *van-der-Waals*-Kräfte und/oder Wasserstoffbrückenbindungen miteinbeziehen. Um das Protein zu eluieren, müssen diese Wechselwirkungen aufgehoben werden. Das kann je nach Säulenmaterial entweder durch einen kompetitiven Liganden oder auch unspezifisch durch Änderung des pH-Wertes oder des Salzgehaltes erreicht werden.

Die behandelten Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem Hexahistidin-, MBP- (engl.: *maltose-binding protein*) oder GST- (Glutathion-S-Transferase) Affinitätsanker hergestellt, so dass als erster Schritt der Proteinreinigung Affinitätschromatographiesäulen verwendet wurden. Diese enthielten je nach Affinitätsanker Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA), Dextrin- oder GSH-Sepharose.

Nickelaffinitätschromatographie

Bei dem Säulenmaterial zur Reinigung von Proteinen mit Hexahistidinanker handelte es sich um NTA, eine Ni²⁺-Ionen bindende Substanz. Hierbei werden vier der sechs Ligandenbindungsstellen des Ni²⁺-Ions besetzt, während die anderen beiden Bindungsstellen frei zugänglich sind und mit den Histidinresten des Ankers Chelatkomplexe ausbilden können. Die lösliche Proteinfraction wurde mit einer Flussrate von 1-3 mL/min auf eine zuvor äquilibrierte Säule aufgetragen und solange mit Laufpuffer gewaschen, bis sich keine Änderung der Absorption bei 280 nm mehr ereignete. Um eine unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial zu vermeiden, wurden dem Laufpuffer 20 mM Imidazol zugesetzt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch einen Imidazolgradienten von 20 bis 250 mM über 20 Säulenvolumina. Bei Proteinreinigungen aus Insektenzellen wurde der Gradient bei einer Absorptionserhöhung bei 280 nm angehalten und erst nach Erreichen der Basislinie weitergeführt. Das Imidazol konkurriert um die Bindungsstellen des Nickels und das Fusionsprotein kann in Fraktionen gesammelt werden. Mittels SDS-PAGE

wurden die Fraktionen auf Reinheit und Proteingehalt geprüft, entsprechende Fraktionen vereint und per Dialyse von Imidazol befreit.

Glutathionaffinitätschromatographie

Bei Glutathion-Sepharosesäulen ist Glutathion mit einem Oxiran-Linker kovalent an Sepharose gekoppelt. Die lösliche Proteinfraction wurde mit einer Flussrate von 1-3 mL/min auf eine zuvor äquilibrierte Säule aufgetragen und solange mit Laufpuffer gewaschen, bis sich keine Änderung der Absorption mehr ereignete. Um eine unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial zu vermeiden, wurde der Salzgehalt des Laufpuffers auf 1 M NaCl erhöht. Das GST-Fusionsprotein bindet an das Säulenmaterial, da GSH als natürliches Substrat eine hohe Affinität zu GST hat. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit GSH-haltigem Puffer (10 mM GSH). Mittels SDS-PAGE wurden die gesammelten Fraktionen auf Reinheit und Proteingehalt geprüft, entsprechende Fraktionen wurden vereint.

Dextrin-Affinitätschromatographie

Dextrin-Sepharose wird zur Reinigung von MBP-Fusionsproteinen verwendet. Dextrin ist das natürliche Substrat für MBP und bindet dieses mit hoher Affinität. Die lösliche Fraktion des Zellysats wurde mit einer Flussrate von 1-3 mL/min auf eine zuvor äquilibrierte Säule aufgetragen und solange mit Laufpuffer gewaschen, bis sich keine Änderung der Absorption mehr ereignete. Um eine unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial zu vermeiden, wurde der Salzgehalt des Laufpuffers auf 1 M NaCl erhöht. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit Maltose-haltigem Puffer (10 mM Maltose). Mittels SDS-PAGE wurden die gesammelten Fraktionen auf Reinheit und Proteingehalt geprüft, entsprechende Fraktionen wurden vereint.

2.3.4 Proteolytischer Verdau

Alle Fusionsproteine wurden mit einer TEV- oder einer PreScission-Schnittstelle zwischen Protein und Affinitätsanker exprimiert, so dass die Anker von den Proteinen entfernt werden konnten. Die Proteasen wurden über Nacht bei 4°C im molaren Verhältnis 1:100 (Protease:Protein) eingesetzt. Für optimale Bedingungen bei dem TEV-Verdau wurde der TEV-Spaltpuffer genutzt (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA).

2.3.5 Präparative Größenausschlusschromatographie

Bei der Gelfiltration oder Größenausschlusschromatographie werden Proteine aufgrund ihres Stokeschen Radius getrennt. Es wird eine poröse Matrix verwendet (Sephadex),

die von Proteinen in unterschiedlicher Weise permeiert wird. Große Moleküle können nicht in die Poren eindringen und haben demnach einen kürzeren Weg durch die Matrix als kleinere Proteine, die sich in den Poren aufhalten können. Die Säule dient gleichzeitig zum Pufferwechsel in einen Niedrigsalzpuffer, der beispielsweise für die Proteinkristallisation notwendig ist. Die Gelfiltration wurde üblicherweise als letzter Schritt einer Reinigung durchgeführt, kann aber auch zu analytischen Zwecken, um z.B. Reinheit oder Bindungsverhalten zu untersuchen, genutzt werden (siehe Abschnitt 2.3.12). Je nach Größe und Menge des Proteins wurde die Superdex 75 16/60, die Superdex 75 26/60 oder die Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) Gelfiltrationssäule verwendet.

Da das aufzutragende Volumen bei der präparativen Gelfiltration 2 bzw. 5 mL nicht überschreiten darf, wurden die Proteine zunächst mit Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore Amicon konzentriert (siehe Abschnitt 2.3.11) und anschließend bei einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule gegeben. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht und dementsprechend vereint und konzentriert.

2.3.6 Ionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Wechselwirkung zweier gegensätzlich geladener Moleküle, wobei eines dabei an die Säulenmatrix gebunden ist. Durch einen ansteigenden Salzgradienten bei fixem pH-Wert können Moleküle in einer Lösung aufgrund ihres isoelektronischen Punktes voneinander getrennt werden.

POROS HS

Negativ geladene Sulfopropylgruppen sind an diese Säulenmatrix gekoppelt, wodurch positiv geladene Proteine gebunden werden. Negativ geladene Moleküle wie zum Beispiel (unspezifisch gebundene) RNA können durch diesen Schritt aus der Lösung entfernt werden. Die zytosolische Fraktion wurde mit einer Flussrate von 10 mL/min auf die zuvor mit einem Niedrigsalzpuffer (25 mM NaCl) äquilibrierte Säule aufgetragen und mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis keine Änderung der Absorption mehr detektiert wurde. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mittels eines 300 mL-Gradienten von 25 bis 1000 mM NaCl. Mittels SDS-PAGE wurden die gesammelten Fraktionen auf Reinheit und Proteingehalt geprüft, entsprechende Fraktionen wurden vereint und per Dialyse oder anschließender Gelfiltration von überschüssigem NaCl befreit. Als weitere Kationenaustauscher-Matrix wurde SP Sepharose XL verwendet, welche vom Prinzip her dem POROS HS Material identisch ist.

Heparin-Agarose

Heparinsäulen wurden zur Reinigung von Nukleinsäure-bindenden Proteinen verwendet. Heparine sind Polysaccharide von variabler Masse (4.000-40.000 Da) und können aufgrund ihrer gebundenen, anionischen Sulfatgruppen als Kationenaustauscher dienen. Heparin verhindert zudem die unspezifische Bindung von RNA an positiv geladene Bereiche von Proteinen, was für die Reinigung von Larp7 von großer Bedeutung war (siehe Abschnitt 4.3). Die zytosolische Proteinfraction wurde mit einer Flussrate von 1-3 mL/min auf eine zuvor äquilibrierte Säule aufgetragen und solange mit Laufpuffer gewaschen, bis eine stabile Basislinie erreicht war. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mittels eines linearen 100 mL-Gradienten von 25 bis 1000 mM NaCl. Mittels SDS-PAGE wurden die gesammelten Fraktionen auf Reinheit und Proteingehalt geprüft, entsprechende Fraktionen wurden vereint.

2.3.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Untersuchung der Reinheit und der Zusammensetzung einer Proteinlösung erfolgte mit dem von Laemmli eingeführten Verfahren der SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dodecylsulfationen lagern sich an Proteine an, denaturieren sie und geben ihnen ihrer Größe entsprechend eine negative Ladung. Daher beeinflusst das Molekulargewicht die Mobilität der Proteine im Gel, wenn dieses einem elektrischen Feld ausgesetzt wird. Die Abschätzung der Proteingrößen erfolgte durch Verwendung eines Molekulargewichtstandards. Die Gelpräparation sowie die Elektrophorese wurden mit dem Mini-Gelsystem der Firma Bio-Rad durchgeführt. Trenn- und Sammelgel wurden nach folgendem Rezept erstellt:

<u>Lösung</u>	<u>Trenngel 15%</u>	<u>Trenngel 18%</u>	<u>Sammelgel 6%</u>
ddH ₂ O	2,4 mL	1,4 mL	1,35 mL
Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	-
Sammelgelpuffer	-	-	0,625 mL
30% (w/v) Acrylamid	5 mL	6 mL	0,5 mL
10% (w/v) SDS	100 µL	100 µL	25 µL
TEMED	5 µL	5 µL	1,25 µL
APS	50 µL	50 µL	12,5 µL

Nach Polymerisation des Acrylamids zu Polyacrylamid in Trenn- und Sammelgel wurden die Proteinproben im Probenpuffer aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Auftragen zumeist bei 95°C über die Dauer von 3 min inkubiert. Bei einer konstanten Spannung von 200 V konnten die Proteine getrennt und in einer Färbelösung gefärbt werden. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 lagert sich an basische und aromatische Aminosäureseitenketten an und färbt so die Proteine unspezifisch an. Das

Gel wurde anschließend wieder entfärbt, wobei die Proteine als blaue Banden im Gel sichtbar werden.

Sammelgelpuffer

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

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,4% (w/v) SDS

10x Laufpuffer

250 mM Tris-HCl pH 8,3
2 M Glycin

2xProbenpuffer

10% (w/v) β -Mercaptoethanol
0,01% (w/v) Bromphenolblau
25% (v/v) Glycerin
2% (w/v) SDS

Färbelösung

0.1% (w/v) Coomassie R250
5% (v/v) Essigsäure
10% (v/v) Ethanol

Entfärbelösung

5% (w/v) Essigsäure
10% (v/v) Ethanol

Um geringe Proteinmengen in einem SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung vorgenommen. Dazu wird das Gel zunächst 30 min in einer Fixierlösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren. Nach mehrmaligem Waschen mit dH₂O wird das Gel in einer Silbernitratlösung gefärbt. So lagern sich Ag⁺-Ionen an die Proteine an. Überschüssige Ionen werden mit Wasser abgewaschen. Durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd werden die Silber-Ionen zu elementarem Silber reduziert. Dies hat eine Schwarzfärbung der proteinhaltigen Stellen im Gel zur Folge. Die Reaktion kann durch Zugabe von EDTA gestoppt werden.

Inkubationslösung

15 mL Ethanol
3,4 g Natrium acetat x 3 H₂O
Formaldehyd
0,1 g Natrium thiosulfat x 5 H₂O
auf 50 mL dH₂O

Fixierlösung

40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Silbernitratlösung

0,05 g Silbernitrat
30 μ L 36% (v/v)
auf 50 mL ddH₂O

Entwicklerlösung

1 g Natriumcarbonat
15 μ L 36% (v/v) Formaldehyd
auf 50 mL ddH₂O

Stopplösung

0,04 M EDTA pH 8.0
10% (v/v) Glycerin

2.3.8 Elektrophoretischer Mobilitätsverschiebungstest (EMSA)

Mithilfe des elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstests (engl.: *electrophoretic mobility shift assay*) wurden Protein-RNA Interaktionen untersucht (Garner und Revzin, 1981; Hellman und Fried, 2007). Das Laufverhalten von RNA in solch einem nativen Glycingel verlangsamt sich bei Bindung an Proteine, eine Verschiebung tritt auf. Zur Trennung von freier RNA und Protein-RNA Komplexen wurde ein 5%-iges Polyacrylamidgel in einem Bio-Rad Mini-Protean III-Gelsystem gegossen. Für alle verwendeten Puffer wurden RNase-freie Chemikalien eingesetzt.

Die RNA-Konstrukte wurden vor jedem Versuch für 2 min auf 80°C erhitzt und langsam abgekühlt, um eine korrekte Faltung zu gewährleisten. In 10 μ L-Ansätzen wurden jeweils 20 pmol RNA mit ansteigenden Mengen (0-100 pmol) an potenziellen

Bindungspartnern in 1x Bindepuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen 6x Auftragspuffer hinzugegeben und auf das Gel aufgetragen. In gekühltem Laufpuffer wurde das Gel einer Stromstärke von 25 mA für 60 min ausgesetzt. Inkubation mit 0,01% Ethidiumbromid ermöglichte die Visualisierung der RNA unter UV-Licht.

Glycingel

1 mL 10x Laufpuffer
7,7 mL ddH₂O
1,3 mL 40% Acrylamid
15 µL TEMED
33 µL 10% APS

10x Bindepuffer

300 mM Tris-HCl pH 7,5
700 mM KCl
55 mM MgCl₂
0,25% (v/v) IGEPAL

10x Laufpuffer

250 mM Tris-HCl pH 8,0
2 M Glycin
10 mM EDTA

6x Ladepuffer

50% Glycerol
0,04% (w/v) Xylencyanol
0,04% (w/v) Bromphenolblau

2.3.9 Denaturierende Urea-Polyacrylamidgelelektrophorese (Urea-PAGE)

Diese Methode wurde zur Darstellung von RNA-Konstrukten verwendet. Zur Herstellung der 10%-igen Ureagele wurde das Bio-Rad Mini-Protean III-Gelsystem verwendet. Die RNA-Fractionen wurden mit Ladepuffer versetzt und 2 min bei 95°C denaturiert. In TBE-Laufpuffer wurden die Gele für etwa 60 min einer Stromstärke von 25 mA ausgesetzt. Inkubation mit 0,01% Ethidiumbromid ermöglichte die Visualisierung der RNA unter UV-Licht.

Ureagel

4,24 g Urea
1 mL 10x TBE-Puffer
2,5 mL 40% Acrylamid
12 µL TEMED
30 µL 10% APS
auf 10 mL ddH₂O

6x Ladepuffer

80% Formamid
0,1% Xylencyanol
0,1% Bromphenolblau
in 1x TBE

2.3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem von Bradford entwickelten Verfahren (Bradford, 1976) und durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm mit jeweiliger Doppelbestimmung.

Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau bindet an die Seitenketten basischer und aromatischer Aminosäuren, wodurch eine Stabilisierung der sauren anionischen Form des Farbstoffs erfolgt. Dies führt dazu, dass das Absorptionsmaximum von 465 nm zu einer Wellenlänge von 595 nm verschoben ist. Mit dem Bradford-Reagenz der Firma

Bio-Rad wurden die Ansätze nach folgendem Schema hergestellt: $(800 - x) \mu\text{L dH}_2\text{O} + x \mu\text{L Protein} + 200 \mu\text{L Bradford-Reagenz}$. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mit einer zuvor erstellten BSA-Eichgerade verglichen, um den Proteingehalt anhand der Absorption abzuschätzen.

Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorption bei 280 nm

Aromatische Aminosäuren in Proteinen absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm. Dies kann zur Konzentrationsbestimmung genutzt werden. Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte auf Grundlage der Aminosäuresequenz mithilfe des Programms ProtParam des Internetservers ExPASy (<https://us.expasy.org>). Die Messungen wurden in einem Nanodrop DN-1000 UV-Spektrometer (Thermo Scientific) durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich die Absorption bei 260 nm gemessen, wodurch Verunreinigungen durch Nukleinsäuren detektiert werden können. Eine reine Proteinprobe weist einen A_{260}/A_{280} Quotienten von 0.57 auf, während eine reine RNA-Probe einem Quotienten von 2 entspricht (ColdSpringHarbProtoc, 2006).

2.3.11 Konzentrierung der Proteine

Proteinlösungen wurden mit Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore Amicon konzentriert oder bei Volumina größer als 100 mL mit der mit Druckluft betriebenen Ultrafiltrationseinheit Vivacell250 (Sartorius stedim). In der Membran dieser Einheiten befinden sich Poren definierter Größe, so dass Moleküle kleinerer Größe die Membran passieren können. Das Protein verbleibt jedoch oberhalb der Membran und wird dort bis zur gewünschten Konzentration angereichert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 3.500 g, der Druckluftkonzentrator wurde mit einem Maximaldruck von 4 mbar betrieben.

2.3.12 Analytische Größenausschlusschromatographie

Das Prinzip der analytischen Größenausschlusschromatographie entspricht dem der präparativen Größenausschlusschromatographie (siehe 2.3.5). Das Volumen der Proteinlösung und der Säulenmatrix ist jedoch viel geringer und die Sensitivität des Detektors ist deutlich höher. Als Säulen wurden je nach Größe der zu untersuchenden Proteine eine Superdex 200 10/300 oder eine Superdex 75 10/300 der Firma GE Healthcare verwendet. Nach der Säulenequilibration mit Laufpuffer wurden die Proteine mittels eines automatischen Injektionssystems mit 0,5 mL/min aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem Zwei-Kanal-Absorptionsdetektor bei 280 nm und 260 nm. Ein Protein-Standard der Firma Bio-Rad diente zur Ermittlung der Proteingröße.

Um die einzelnen Peaks auf ihre Proteinzusammensetzung überprüfen zu können, wurden vom Eluat der Gelfiltrationsläufe fortlaufend 500 µL Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend mit Aceton bzw. Lithiumchlorid-Isopropanol gefällt und gelelektrophoretisch per SDS- oder Urea-PAGE untersucht.

2.3.13 Acetonfällung von Proteinen

Um geringe Proteinmengen gelelektrophoretisch untersuchen zu können, wurden die Proteinbestandteile einer Lösung mit Aceton gefällt. Dazu wurden 200 µL einer Proteinlösung mit 800 µL Aceton vermischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Pelletierung des Proteins durch Zentrifugation bei 13.000 g für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde entfernt, so dass das Proteinpellet an der Luft getrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen werden konnte. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE.

2.3.14 Lithiumchlorid-Isopropanolfällung von RNA

Geringe RNA-Mengen wurden mit dieser Methode aus einer Lösung gefällt und gelelektrophoretisch untersucht. Dazu wurden 200 µL der RNA-Lösung mit 2 µL Glykogen (20 mg/mL) als Trägermaterial (engl.: *carrier*), 200 µL Isopropanol und 20 µL Lithiumchlorid (8 M) versetzt. Nach 30 min bei -80°C wurden die Ansätze bei 13.000 g für 15 min zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Nach Trocknen an der Luft wurde das Pellet in Formamidprobenpuffer aufgenommen und per Urea-PAGE analysiert.

2.3.15 GST-Immobilisationsexperiment

Bei GST-Immobilisationsexperimenten (engl.: *GST-pull-downs*) wird die Bindung zwischen zwei Proteinen untersucht. Hierbei wird ein Protein als GST-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt und an einer GSH-Matrix (engl.: *beads*) immobilisiert. Durch Inkubation mit einem potentiellen Interaktionspartner wird bei entsprechender Bindung auch dieser immobilisiert und beide Proteine können durch gelelektrophoretische Analyse detektiert werden. Je nach Konzentration der eingesetzten Proteine können typischerweise Interaktionen mit Dissoziationskonstanten von bis zu 10 µM nachgewiesen werden.

Zur Herstellung von proteinbeladenen GSH-*beads* wurden die GST-Fusionsproteine in einer 500 mL-Kultur exprimiert. Nach Zellaufschluss und Klärung des Lysats durch Zentrifugation wurde die zytosolische Fraktion mit äquilibrierten *beads* für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach mehrfachen Wasch- und Zentrifugationsschritten (3 min, 2.000 g) wurde

die Reinheit des immobilisierten Proteins per SDS-PAGE analysiert und bei -80°C gelagert.

Die Bindungsanalysen wurden in einem Volumen von 500 µL in einem adequaten Bindepuffer durchgeführt. Die Ansätze enthielten typischerweise 2 µg immobilisiertes Protein und ~2 nmol des Bindungspartners, welche zusammen für 2 h bei 4°C inkubiert wurden. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Ansätze mit SDS-Probenpuffer versetzt und per SDS-PAGE analysiert.

Analog zu dieser Methode wurden auch Bindungsexperimente mit MBP-Fusionsproteinen, welche an Dextrin-*beads* immobilisiert wurden, durchgeführt.

2.3.16 Gradientenzentrifugation

Der Komplex aus P-TEFb, Larp7, Hexim1 und 7SK wurde mittels der GraFix Methode (Kastner et al., 2008) für die Untersuchung im Elektronenmikroskop vorbereitet. Hierbei wurde die Probe in einem linearen Glycerolgradienten von 10–30% unter Zusatz eines milden chemischen Quervernetzers (engl.: *Crosslink*; ~0,1% Glutaraldehyd) zur Stabilisierung des Komplexes für 16 h bei 40.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert und auf Proteingehalt im Elektronenmikroskop untersucht. Diese Methodik wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Holger Stark am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

2.3.17 Thermofluoruntersuchungen

Um die Reinigung des inhibierten P-TEFb Komplexes (Cdk9, Cyclin T1, Hexim1, Larp7 und 7SK) für elektronenmikroskopische Untersuchungen zu optimieren, wurden Thermofluormessungen in Kooperation mit Prof. Dr. Holger Stark und David Haselbach am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt (Niesen et al., 2007). Hierbei wird im 96-Lochformat die Proteinprobe bei einer Konzentration von 0,2 µM mit verschiedenen Additiven oder Puffern versetzt (pHat Pufferscreen, Emerald Biosystems; Additive Screen, Hampton Research) und schrittweise auf 95°C erhitzt. Die Zugabe von SYPRO Orange (Sigma-Aldrich), ein Fluoreszenzfarbstoff, ermöglichte die Bestimmung der Schmelztemperatur und der Änderung der Enthalpie (ΔH), da der Farbstoff an hydrophobe Bereiche des Proteins bindet, welche erst nach Denaturierung zugänglich werden. So konnten Bedingungen identifiziert werden, die zur Stabilisierung des Komplexes beitragen. Die Messungen wurden mit dem Gerät CFX96 (Biorad) durchgeführt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Transformation und Transposition

Nach der Erstellung rekombinanter pFastBac-Plasmide und ihrer Überprüfung auf Vollständigkeit und Sequenzidentität, konnte die DNA in DH10Bac-Zellen transformiert werden (siehe Abschnitt 2.2.6), um eine Transposition in das Bacmid zu ermöglichen. Hierzu wurden etwa 1 ng des rekombinanten Plasmids mit einem auf Eis aufgetauten Aliquot an DH10Bac Zellen vermischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 s wurden 900 µL 2TY Medium hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde für 4 h bei 37°C und 150 rpm geschüttelt und anschließend in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) auf Differenzierungsagarplatten ausgestrichen. Nach 48 h bei 37°C wurden weiße Kolonien isoliert und zur Kontrolle erneut auf Differenzierungsagarplatten ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Weiße Kolonien wurden nun in 2 mL LB-Medium, das mit Kanamycin (50 µg/mL), Gentamycin (7 µg/mL) und Tetrazyklin (10 µg/mL) angereichert war, für die Isolation des Bacmids herangezogen (24 h, 37°C, 150 rpm).

2.4.2 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA

Die Isolation des Bacmids erfolgte aus 2 mL-Kulturen (siehe Abschnitt 2.4.1). Die Zellen wurden eine Minute bei 14.000 g pelletiert und in 300 µL 15 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A resuspendiert. Zur Lyse wurden 300 µL 200 mM NaOH, 1% SDS hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 300 µL 3 M KOAc pH 5,5 zu dem Ansatz gegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugation bei 14.000 g für 10 min wurde mit 800 µL Isopropanol vermischt und wahlweise über Nacht bei -20°C gelagert oder 10 min auf Eis inkubiert. Durch erneute Zentrifugation bei 14.000 g für 15 min konnte die DNA pelletiert und mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen werden. Das Pellet wurde anschließend luftgetrocknet und in 40 µL sterilem TE-Puffer aufgenommen. Die Bacmid-DNA konnte nun für Transfektionen von Sf21 verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden.

2.4.3 Kultivierung von Sf21 Zellen

Sf21 ist eine kontinuierliche Zelllinie, die ursprünglich aus den Eierstöcken der Mottenart *Spodoptera frugiperda* isoliert wurde. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in TC100 Medium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 1% (v/v) Pluronic und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung oder in Sf-900™ III SFM 1x Insektenzellflüssigmedium mit 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung. Zum Anwachsen wurden die Zellen adhärent in Petrischalen kultiviert, bei größeren Mengen als Suspensionskulturen in Erlenmeyer-

oder Fernbachkolben bei 27°C. Die Zellen wurden regelmäßig mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und kontinuierlich innerhalb einer Dichte von $0,5-2 \cdot 10^6$ Zellen/mL gehalten.

2.4.4 Transfektion von Sf21 Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA

Für die Transfektion von Sf21 Zellen mit Bacmid-DNA wurden $1,8 \cdot 10^6$ Zellen in 2 mL Medium in einer 6-Loch-Platte ausgesät und zum Anwachsen für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Pro Ansatz wurden 6 µL Cellfectin und 5 µL Bacmid-DNA mit jeweils 100 µL Medium verdünnt und anschließend in insgesamt 1 mL Medium vereint. Nach 45 min Inkubationszeit wurden die Ansätze auf die zuvor gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 5 h bei 27°C inkubiert, anschließend wurde der Überstand entfernt und 2 mL frisches Medium hinzugefügt. Der virushaltige Überstand (P1) konnte nach 72 h geerntet, durch Zentrifugation geklärt (5 min, 2.000 g) und bei 4°C gelagert werden.

2.4.5 Plaque-Assay

Um die Viruspartikeldichte zu bestimmen, wurden sogenannte Plaque-Assays durchgeführt. Dazu wurden 10^6 Zellen in 2 mL Medium pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und zum Anwachsen für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Zudem wurde von der zu untersuchenden, frischen Viruslösung eine Verdünnungsreihe in Serum-freien Medium erstellt (1:100 bis 1:1.000.000). Nach Abnahme des Zellüberstands wurden die Verdünnungen sowie eine Kontrolllösung ohne Virus in jeweils ein Loch der 6-Loch-Platte gegeben. Diese Platte wurde nun eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Agarosemischung bestehend aus 1,25% Agarose, 50% Medium und Wasser wurde auf 47°C erhitzt und erneut mit einem gleichen Anteil Medium (Raumtemperatur) verdünnt. Je 2 mL dieser Mischung wurden sehr vorsichtig auf die vom Überstand befreiten Zellen gegeben. Um die Plaques („Löcher“ im Zellrasen) besser sichtbar zu machen, wurden nach fünf Tagen Inkubation bei 27°C 0,5 mL einer 0,1%-igen (w/v) Neutralrotlösung zu den mit Agarose-überschichteten Zellen gegeben. Neutralrot färbt Lysosomen an und nach 2 h wurden die Plaques deutlich sichtbar und der Titer konnte mit folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Virustiter} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right) = \frac{\# \text{ der Plaques}}{\text{Verdünnungsfaktor} * \text{Inokulumvolumen (mL)}}$$

Mit pfu: Plaque formende Einheit (engl.: *plaque forming unit*).

2.4.6 Virusamplifikation

Für die erste Virusamplifikation wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen in 10 mL Medium mit einer Multiplizität der Infektion (MOI, engl.: *multiplicity of infection*) von 0,05 pfu/mL infiziert:

$$\text{Benötigtes Inokulum (mL)} = \frac{\text{MOI} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right) * \# \text{ der Zellen}}{\text{Virustiter} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right)}$$

Nach drei Tagen wurde der Virusüberstand (P2) durch Zentrifugation geerntet. Im nächsten Amplifikationsschritt wurden 100-200 mL einer Sf21 Kultur mit 10^6 Zellen/mL mit einer MOI von 0,1 pfu/mL infiziert und drei Tage bei 27°C inkubiert. Nach Klärung wurde der Viruspartikel-haltige Überstand (P3) im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.4.7 Proteinexpression in Sf21 Zellen

Die Proteinexpression wurde bei einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL und einer MOI von 0,5-5 pfu/mL durchgeführt. Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 2.000 g geerntet, mit 1x PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation nach Schockfrieren in Flüssigstickstoff bei -80°C gelagert. Bei Coexpression von Cdk9 und Cyclin T1 wurden die entsprechenden Viren in einem Verhältnis von 5:3 (Cdk9:Cyclin T1) zu den Zellen gegeben.

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) diente in dieser Arbeit zur Massenbestimmung gereinigter Proteine. Mit Hilfe dieser sehr sensitiven und schonenden Ionisierungsmethode ist es möglich, Proteine unzersetzt in die Gasphase zu transferieren. Zunächst wird hierbei die Probe mit Hilfe einer C₄-Säule entsalzt. Die Probe wird dann aus einer Mikrokapillare versprüht, auf welcher ein hohes Potenzial relativ zum Massenspektrometer angelegt ist. Sind die elektrostatischen Kräfte der angelegten Spannung größer als die Oberflächenspannung der Probe, entsteht ein *taylor-cone* an der Spitze der Kapillare. So entstehen hoch-geladene Tröpfchen, die nach Evaporation des Lösungsmittels einen feinen Sprühnebel bilden. Dieser wird dann in den Massenanalysator gesaugt. Zum Nachweis der Proteine diente die Bestimmung der Flugzeit (TOF, engl.: *time of flight*). Der Grad der Ionisation ist proportional zur Größe des Proteins, somit erreichen große Proteine schneller den Ionendetektor als

kleinere Proteine. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Xcalibur 2.0.7 und MagTran1.02.

2.5.2 Isothermale Titrationskalorimetrie

Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC, engl.: *isothermal titration calorimetry*) ist eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung thermodynamischer Parameter einer Reaktion zweier Moleküle (Wiseman et al., 1989). Die Interaktion zweier Proteine wird meist von einem energetischen Prozess begleitet. Dieser Prozess äußert sich als messbare Wärmeabgabe oder –aufnahme. In der Messzelle befindet sich ein Reaktand zu dem ein potentieller Ligand kontinuierlich titriert wird. Beide Zellen sind über einen elektrischen Regelkreis miteinander verbunden und thermisch isoliert, so dass bei einer Wärmeänderung in der Messzelle eine Verringerung bzw. Erhöhung des Heizstroms notwendig ist, um die Temperatur konstant zu halten. Das Integral der Wärmetönung wird gegen das molare Verhältnis der Proteine aufgetragen. Aus dem Kurvenverlauf einer Bindung können nun thermodynamische Parameter wie die Änderung der Enthalpie ΔH^0 , aber auch die Gleichgewichtskonstante K und die Stöchiometrie bestimmt werden. Daraus lassen sich die Änderungen der freien Energie ΔG^0 und der Entropie ΔS^0 nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung und der Gleichgewichtskonstanten berechnen:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

ΔH^0 und ΔS^0 können einen unterschiedlich starken Einfluss auf die freie Energie haben. So wird die Wärmeänderung von den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Protein, Ligand und Lösungsmittel bestimmt. Dazu gehören Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen, *van-der-Waals*-Kräfte und strukturelle Änderungen der Solvathülle (Fisher and Singh, 1995). Die Änderung der Entropie wird durch weitere Faktoren charakterisiert. Durch das Auflösen der Solvathülle der Proteine erhöht sich die Entropie im System. Die Komplexbildung führt jedoch dazu, dass dem System Partikel entzogen werden, wodurch Seitenketten an Flexibilität verlieren und die Entropie sich verringert. Zusammenfassend wurden diese Effekte als Solvatisierungs- und Konformationsentropie beschrieben (Jelesarov and Bosshard, 1999).

ITC-Experimente wurden mit einem VP-ITC oder einem iTC₂₀₀ (Microcal) durchgeführt. Bei dem VP-ITC entsprach das Volumen in der Zelle 1,435 mL und das der Titrationsspritze 0,5 mL. In Schritten von typischerweise 8 μ L wurde der Ligand in die

Zelle titriert. Die benötigten Volumina bei dem iTC_{200} waren deutlich geringer mit einem Zellvolumen von 250 μL und einem Spritzenvolumen von 60 μL . Hier entsprach das Injektionsvolumen 2 μL . Vor der Messung wurden beide Proben vollständig entgast. Beide Reaktanden müssen in identischem Puffer gelöst sein, um eine Veränderung des Signals durch Pufferinteraktionen zu verhindern. Die Messungen wurden wahlweise bei 15°C oder bei 25°C durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit dem Programm ORIGIN 7.0.

2.5.3 Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Der molare Extinktionskoeffizient eines chiralen Makromoleküls ist für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht verschieden. Daher weist rechts- und links-zirkular polarisiertes Licht nach dem Verlassen eines optisch aktiven Mediums eine unterschiedliche Intensität auf. Die Überlagerung ist nun nicht mehr linear, sondern elliptisch. Diese Erscheinung wird als Circular-Dichroismus (CD) bezeichnet. Chromophore innerhalb eines Proteins (z.B. Amidbindungen im Proteinrückgrat, aromatische Seitenketten und Disulfidbindungen) sind optisch aktive Verbindungen, welche in der Proteinsekundärstruktur regelmäßig angeordnet sind. Das CD-Spektrum beruht auf dieser Anordnung. Durch Auftragen der mittleren Elliptizität pro Aminosäure (engl.: *mean residue ellipticity*; $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) gegen die Wellenlänge kann man Hinweise auf die Faltung eines Proteins erlangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CD-Spektroskopie verwendet, um die Faltung von gereinigten Proteinen zu überprüfen und um die Stabilität verschiedener Proteine in Anwesenheit weiterer Bindungspartner zu charakterisieren. Dazu wurden temperaturabhängige De- bzw. Renaturierungskurven erstellt. Die CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 190 nm und einer Temperatur von 20°C aufgenommen. De- bzw. Renaturierungskurven wurden bei Temperaturen von 5 bis 95°C und einer Wellenlänge von 222 nm erstellt. Die Proteine wurden im 5 mM KP_i Puffer pH 7,4 verdünnt und bei einer Konzentration von 5 μM in einer 2 mm Quarzküvette untersucht. Sämtliche Messungen wurden bei einem Stickstofffluss von 3 L/min, einer Schrittweite von 1 nm und einer Integrationszeit von 1 s durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ORIGIN 7.0. Zur Überprüfung der Sekundärstruktur wurden Algorithmen des Servers Dichroweb verwendet (Lobley et al., 2002; Whitmore and Wallace, 2004).

2.5.4 Dynamische Lichtstreuung

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS, engl.: *dynamic light scattering*) misst das von solubilisierten Makromolekülen gestreute Licht (Rayleigh-Streuung). Das

Streulicht verschiedener Streuzentren interferiert dabei. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung können Fluktuationen der Streuintensität beobachtet werden. Durch Analyse dieser Fluktuationen hinsichtlich ihres zeitlichen Auftretens, lässt sich die Geschwindigkeit der sich in Lösung bewegenden Moleküle bestimmen. Die sich daraus ergebende Korrelationsfunktion gibt Aufschlüsse über den Diffusionskoeffizienten und über die Stokes-Einstein-Gleichung kann damit der hydrodynamische Radius des Moleküls berechnet werden.

$$D = \frac{k_B T}{6\eta\pi r}$$

Mit D: Diffusionskoeffizient, k_B : Boltzmannkonstante, T: absolute Temperatur, η : Viskosität, r: Radius.

DLS wurde zur Ermittlung der Dispersität von Proteinpräparationen vor Kristallisation oder Kleinwinkelstreuung genutzt.

2.6 Strukturbiologische Methoden

2.6.1 Proteinkristallisation

Proteinkristallisation ist ein empirisches Verfahren, bei dem das Protein langsam aus einer wässrigen Lösung präzipitiert wird. Im Idealfall bildet sich dabei eine geordnete, periodische Gitterstruktur, die als Proteinkristall bezeichnet wird. Die dreidimensionale Struktur eines Proteins kann durch Beugung von Röntgenstrahlung am Kristall bestimmt werden.

Kristallwachstum wird durch Reinheit und strukturelle Uniformität des Proteins begünstigt. Weitere Faktoren, die die Proteinkristallisation beeinflussen, sind Proteinkonzentration, Temperatur, pH und Präzipitant. Als Präzipitanten dienen meist Salze oder Polymere, die mit dem Protein um Wasser konkurrieren.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Dampfdiffusion genutzt. Die Proteinlösung befindet sich in einem 1:1 Gemisch mit der Reservoirlösung als hängender oder sitzender Tropfen in einer geschlossenen Kammer. Unterhalb des Tropfens befindet sich ein Reservoir. Dampfdiffusion führt dazu, dass die Proteinlösung übersättigt und in die labile Phase überführt wird. Im Idealfall bringt dies Nukleation mit sich. Die Übersättigung wird nun wieder reduziert, da dem System Protein entzogen wird, so dass dieses in die metastabile Phase zurückkehren kann. In der metastabilen Phase findet das

Kristallwachstum statt, welches optimalerweise langsam und hoch koordiniert verläuft (siehe Abbildung 15).

Zunächst wurden zahlreiche Kristallisationsbedingungen nach der Methode der sitzenden Tropfen getestet. Dazu wurden 96-well Platten der Firma Greiner mit 80–100 μL Reservoirlösung aus Qiagen Kristallisationscreens befüllt und mit Hilfe des Mosquito oder des Art Robbins Phoenix Kristallisationsroboters 200 nL große Tropfen (Verhältnis Protein:Reservoir 1:1) pipettiert. So konnten initiale Kristallisationsbedingungen mit kleiner Kristallbildung entdeckt werden, welche anschließend optimiert wurden. Zur Optimierung wurden 24-well Platten der Firma Linbro mit einem Reservoirvolumen von 500-1000 μL und einem Tropfenvolumen von 1-2 μL verwendet. Hier wurde die Methode der hängenden Tropfen genutzt. Durch Veränderung des Puffers und der Präzipitantenkonzentration konnten günstige Bedingungen identifiziert werden, die weiterhin durch Einsetzen von Additiven optimiert wurden.

Für die Datenaufnahme wurden die Kristalle mit einer passenden Nylon-Öse in eine geeignete Cryolösung überführt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Cryolösung, eine Lösung von hoher Viskosität, verhindert dabei die Bildung von Eiskristallen, die bei der Datenaufnahme stören würden.

Selenomethioninkristalle wurden nach dem gleichen Verfahren produziert, wobei die Bedingungen von denen der nativen Kristalle leicht abwichen.

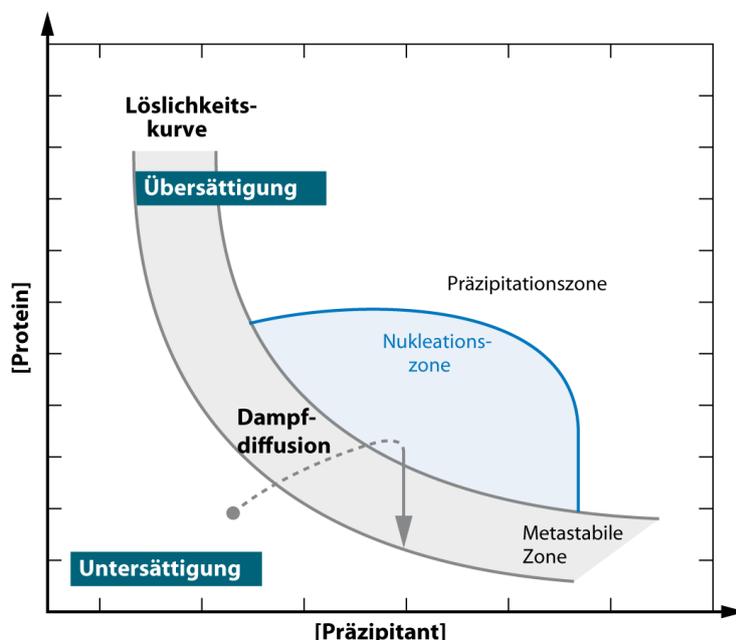


Abbildung 15: Vereinfachtes Phasendiagramm für ein Protein als Funktion der Präzipitantenkonzentration. Der Pfad für die Dampfdiffusion ist eingezeichnet. Kristallwachstum findet ausschließlich in der übersättigten Zone statt, in welcher sich die Proteinkonzentration in der Präzipitantenlösung jenseits ihrer Löslichkeit befindet. In der untersättigten Zone lösen sich Kristalle auf und können sich nicht neu bilden (nach Li and Ismagilov, 2010).

2.6.2 Datenaufnahme

Alle Kristalle wurden zunächst am institutseigenen Röntgengenerator (Rigaku MAR Generator) auf Röntgenbeugung getestet. Geeignete Kristalle wurden an der *Swiss Light Source* (SLS) in Villigen, Schweiz, an den Röntgenquellen X10SA und X06SA vermessen. Für einen nativen Kristall und einen Seleno-Methionin-Kristall wurde jeweils ein vollständiger Datensatz aufgenommen. Die Datenstatistiken sind in Tabelle 1, Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

2.6.3 Das Phasenproblem

In Röntgenbeugungsexperimenten detektiert man die Intensitäten der an Ebenen (hkl) im Kristall gestreuten Röntgenwellen. Die Amplitude der Welle, der Strukturfaktor (F_{hkl}), ist proportional zu der Quadratwurzel der Intensität. Um die Elektronendichte ρ an einer Position (xyz) in der Einheitszelle des Kristalls zu bestimmen dient folgende Formel:

$$\rho(xyz) = 1/V \sum |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp(-2\pi i hx + ky + lz)$$

Mit V: Volumen der Einheitszelle, α_{hkl} : Phasenwinkel.

Das Phasenproblem beschreibt den Umstand, dass in Röntgenbeugungsexperimenten im Gegensatz zur Amplitude der Phasenwinkel α_{hkl} nicht detektiert wird, wodurch eine Berechnung der Elektronendichte per Fouriersynthese nicht möglich ist.

Es gibt mehrere Methoden zur Lösung des Phasenproblems. Die Methode des molekularen Ersatzes, bei der die Phasen einer bekannten ähnlichen Kristallstruktur zur Lösung benutzt werden, konnte in dieser Arbeit nicht angewendet werden, da es kein geeignetes Modell gab. Daher wurden die Phasen für Hexim1 TBD(Δ stammer) unter Zuhilfenahme anomaler Dispersion bei einer Wellenlänge (SAD, engl.: *single wavelength anomalous dispersion*) zusätzlich zu einem nativen Datensatz bestimmt.

2.6.4 Single wavelength anomalous dispersion (SAD)

Die Absorption von Röntgenstrahlung ist umso effektiver je schwerer ein Atom ist. Absorptionskurven von schweren Elementen weisen sogenannte Absorptionskanten auf. Anomale Streuung erfolgt, wenn sich die Energie der benutzten Röntgenstrahlung nahe einer Absorptionskante eines sich im Kristall befindlichen Elements befindet. Bei der SAD-Methode wird das anomale Signal eines Schweratom-haltigen Kristalls gemessen. In dieser Arbeit wurde dazu Selenomethionin-haltiges Hexim1 TBD(Δ stammer) produziert und kristallisiert. Durch Veränderung der Wellenlänge auf die Selen-

Absorptionskanten-spezifische Wellenlänge ($\sim 0,98 \text{ \AA}$) kann das anomale Signal des Selens detektiert werden. Eine Konsequenz der anomalen Streuung ist, dass Friedel's Gesetz nicht länger gültig ist: $|F_{hkl}| \neq |F_{-h-k-l}|$. Die Zentrosymmetrie eines normalen Diffraktionsmusters ist nicht länger erhalten. Die Differenz $|F_{hkl}| - |F_{-h-k-l}|$ kann nun dazu genutzt werden, um die Positionen der anomalen Streuer zu identifizieren und damit die Phasen zu berechnen. Es werden also nur die anomalen oder Bijvoet-Differenzen gemessen: $\Delta F^{\pm} = |F_{PH}(+)| - |F_{PH}(-)|$, wobei F_{PH} den Strukturfaktor des Schweratomhaltigen Kristalls beschreibt. Die Bijvoet-Differenzen werden dann benutzt, um den Streuanteil der Schweratome abzuschätzen, wodurch man über die Patterson-Methode die Positionen der Schweratome bestimmen kann. Patterson-Karten können ohne Phaseninformationen erstellt werden und enthalten Informationen über interatomare Abstände. Abbildung 16 zeigt eine Harker-Konstruktion mit den Parametern, die bei der Berechnung der Phasen mittels SAD von Bedeutung sind. Hieraus wird deutlich, dass nun F_H (Strukturfaktor des anomalen Streuers) und auch die zugehörige Phase α_H bestimmt werden können. Für die Phase des Proteinstrukturfaktors α_P gibt es allerdings zwei mögliche Lösungen. Durch Dichtemodifikationen kann dieses Problem gelöst werden (besprochen in Taylor, 2010). Methoden der Dichtemodifikation basieren auf der Tatsache, dass etwa 50% eines Proteinkristalls aus Lösungsmittel bestehen. Das Lösungsmittel befindet sich in Kanälen und ist ungeordnet. Die Lösungsmittel-elektronendichte wird während der Dichtemodifikation abgeflacht. Zusätzlich kann noch die Methode Histogrammabstimmung genutzt werden. Hierbei werden die Werte der

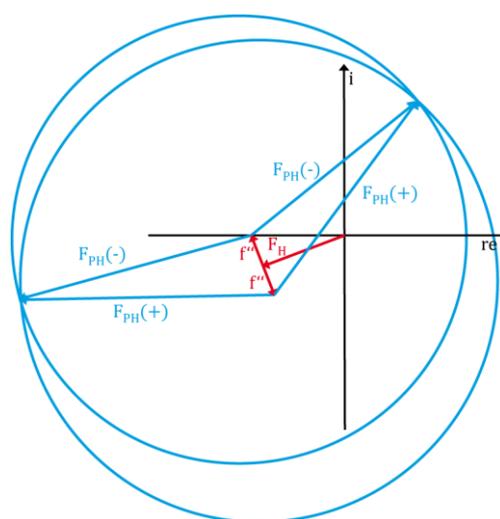


Abbildung 16: Harker-Konstruktion für SAD für einen Reflex h,k,l . Aus den gemessenen Bijvoet-Differenzen kann der Streuanteil der Schweratome abgeschätzt werden. Daraus lassen sich deren Positionen berechnen, woraus man auf F_H und α_H schließen kann. f'' beschreibt den Absorptionsbeitrag zur anomalen Streuung. Final lassen sich auch F_P und α_P bestimmen. F_P (nicht eingezeichnet) reicht vom Ursprung zu den Schnittpunkten der Harker-Projektionen. Für α_P gibt es allerdings erst nach weiteren Dichtemodifikationen eine eindeutige Lösung.

Elektronendichtepixel mit Dichtehistogrammen einer idealisierten Proteinstruktur ver- und angeglichen. Nicht-kristallographische Symmetrien, bei beispielsweise zwei oder mehr Untereinheiten in der asymmetrischen Einheit, können auch zur Optimierung der Elektronendichte herangezogen werden.

2.6.5 Datenprozessierung, Modellbau und Verfeinerung

Die Datenprozessierung erfolgte mit dem Programmpaket XDS (Kabsch, 1993). Eine interne Skalierung der Daten wurde mit dem Programm XSCALE durchgeführt.

Zur Analyse des Datensatzes des Selenomethionkristalls wurde das Programm SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002) verwendet. Das Programm berechnet aus den gemessenen anomalen Differenzen mit Hilfe der Pattersonmethode die Positionen der anomalen Streuer. Die Verfeinerung der Schweratompositionen und die Phasierung erfolgten mit dem Programm SHARP (Global Phasing Limited) durch ein iteratives Dichtemodifikationsverfahren. Die so berechnete Elektronendichte ermöglichte das Erkennen der Sekundärstrukturelemente, so dass ein Modell in Coot (Emsley et al., 2010) erstellt werden konnte. Das so erstellte Modell war unvollständig und fehlerhaft (unwahrscheinliche Torsionswinkel, fehlende Seitenketten, falsche Bindungslängen und -winkel) und wurde durch einen abwechselnden iterativen Prozess im lokalen und globalen reziproken Raum mit dem Programm Refmac5 (Murshudov et al., 1997) verfeinert. Hierbei konnte auch der R-Faktor (R_{work}), ein Maß für die Güte des Modells, verbessert werden.

$$R_{work} = \frac{\sum_{h \notin free} |F_{obs} - kF_{calc}|}{\sum_{h \notin free} F_{obs}}$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{h \in free} |F_{obs} - kF_{calc}|}{\sum_{h \in free} F_{obs}}$$

Der freie R-Faktor (R_{free}) validiert die Korrektheit des Modells, da hier 5% nicht verfeinerter Daten verwendet werden. Dadurch verhindert man die Überanpassung des Modells durch eine artifizielle Verfeinerung.

Die grafische Darstellung der Strukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL 1.2r1 (DeLano Scientific). Das elektrostatische Oberflächenpotential wurde in dem Zusatzmodul für PyMOL (Lerner and Carlson, 2006) mit dem Programm APBS (Baker et al., 2001) berechnet.

2.6.6 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, engl.: *small angle X-ray scattering*) ermöglicht die strukturelle Untersuchung von Makromolekülen in Lösung. Vorteile gegenüber der Röntgenkristallographie sind, dass kein kristallines Material benötigt wird und dass die Struktur der Makromoleküle nicht durch kristallographische Artefakte gestört wird. Zudem kann der strukturelle Einfluss bei Zugabe von Additiven oder Bindungspartnern untersucht werden. Die Auflösung ist jedoch mit 10–50 Å vergleichsweise gering, es können damit nur Informationen über die Größe und Form der Moleküle gewonnen werden (besprochen in Koch et al., 2003; Putnam et al., 2007).

Wie bei der Röntgenkristallographie wird auch bei einem SAXS Experiment die Probe mit Röntgenstrahlung illuminiert und die Diffraktion von einem Detektor registriert. Zusätzlich wird das Lösungsmittel allein vermessen, dessen Streusignal anschließend von dem der Probe abgezogen wird. So kann der Beitrag zur Diffraktion der sich in Lösung befindlichen Makromoleküle bestimmt werden. Es ergibt sich eine radial symmetrische Streukurve, da das Signal aus allen Orientierungen des Moleküls in Lösung gemittelt ist. Die Streukurve $I(q)$ ist abhängig von dem Impulstransfer $q = (4\pi \sin\theta)/\lambda$, wobei 2θ den Streuwinkel und λ die Wellenlänge bezeichnet. In einer homogenen, monodispersen Lösung kann die Streukurve von der Elektronenverteilung $P(r)$ des Moleküls abgeleitet werden.

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr$$

D_{\max} beschreibt hier den maximalen vorhandenen Abstand zweier Atome im streuenden Molekül.

Mithilfe des Guinier-Plots (Intensität I vs. q^2) kann der Gyrationradius R_G und $I(0)$ bestimmt werden. Bei kleiner Auflösung gilt:

$$I(q) = I(0) \exp[-(q^2 R_G^2)/3]$$

Die Paarverteilungsfunktion $P(r)$ ist eine Autokorrelationsfunktion die direkt per Fouriertransformation von der Streukurve berechnet werden kann. Sie gibt unmittelbare Informationen über die Abstände der Elektronen im streuenden Molekül wieder. $P(r)$ kann auch direkt aus der Elektronendichte berechnet werden:

$$P(r) = r^2 \left\langle \int_V \Delta\rho(r) \Delta\rho(u+r) dr \right\rangle_{\Omega}$$

Dies erlaubt die Berechnung von theoretischen Streukurven von Proteinkristallstrukturen. Diese Kurven können dann mit denen in Lösung aufgenommenen Streukurven verglichen werden. In dieser Arbeit wurden zudem *ab initio* Modelle von einem P-TEFb/Hexim1 Komplex und Larp7 berechnet (Franke and Svergun, 2009).

Die Messungen und Datenanalysen erfolgten in Kooperation mit Dr. Weifeng Shang, Dr. Clement Blanchet und Prof. Dr. Dmitri Svergun am EMBL, Hamburg. Die Datenaufnahme erfolgte an der EMBL BioSAXS Röntgenquelle X33 des DORIS Speicherrings am DESY, Hamburg. Die Daten wurden bei einer Wellenlänge von 1,54 Å aufgenommen und die Distanz der Probe zum Detektor betrug 2,7 m (Roessle et al., 2007). Alle Proben wurden unter Benutzung eines PILATUS-Detektors gemessen. 5 mg/mL BSA (engl.: *bovine serum albumin*) diente als Standard für die Molekulargewichtsbestimmung.

2.6.7 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des P-TEFb/Hexim1/7SK/Larp7 Komplexes wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Holger Stark, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen durchgeführt. Aufgrund der kurzen Wellenlänge von Elektronen ist die Auflösung im Elektronenmikroskop (~1 nm) deutlich höher als in optischen Mikroskopen (~200 nm). Daher eignet sich die Methode zur strukturellen Analyse makromolekularer Komplexe, die ein Molekulargewicht von mindestens 150 kDa aufweisen. Hierbei wird in einer Elektronenkanone ein Elektronenstrahl erzeugt und in Richtung einer Anode beschleunigt. Elektrostatische und elektromagnetische Linsen fokussieren den Strahl ähnlich den optischen Linsen in Lichtmikroskopen. Sobald die Elektronen auf die Probe treffen, werden sie gestreut und weitere objektive Linsen refokussieren den Strahl in ein Fourier-transformiertes Abbild des Diffraktionsmusters. Ein Detektor registriert das Abbild. In dieser Arbeit wurde das Elektronenmikroskop CM200 FEG von der Firma Philips benutzt. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise kann bei (Stark et al., 2010) nachgeschlagen werden.

3. ERGEBNISSE

In einer humanen Zelle liegen etwa 50% von P-TEFb in dem 7SK snRNP vor (siehe Abschnitt 1.4). Hexim1 und 7SK snRNA inhibieren die Kinaseaktivität von Cdk9, während Larp7 7SK stabilisiert und vor Degradation schützt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der negativ regulierte P-TEFb-Komplex detailliert untersucht werden. Für die Analyse des Komplexes wurden verschiedene Konstrukte der Untereinheiten Cdk9, Cyclin T1, Hexim1, Larp7 und 7SK sowohl separat als auch in Komplexen exprimiert, gereinigt und auf ihre Interaktionen hin untereinander biochemisch und strukturell untersucht.

Der erste Teil der Ergebnisse beschäftigt sich mit der kristallographischen Analyse der Hexim1-Dimerisierungsdomäne. Im zweiten Teil wird die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb strukturell untersucht. Abschnitt 3.3 befasst sich mit der Untersuchung des Larv- verwandten Proteins Larp7 und dessen Wechselwirkung mit 7SK snRNA. Der vierte Teil beschreibt die Präparation des vollständigen 7SK snRNPs und erste strukturelle Analysen mittels Cryo-Elektronenmikroskopie. Im abschließenden Kapitel wird die Rekonstitution des viral aktivierten Komplexes aus Cyclin T1, HIV-1 Tat und HIV-1 TAR erläutert.

3.1 Hexim1 TBD(Δ stammer) bildet ein kontinuierliches *coiled coil*

Da die Interaktion von Cyclin T1 und Hexim1 im Detail bisher nicht hinreichend geklärt werden konnte, sollte über die Kokristallisation beider Komponenten strukturelle Aufschlüsse über die molekularen Wechselwirkungen der Proteine gewonnen werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich von Hexim1, die TBD, für die Bindung an Cyclin T1 verantwortlich ist (Schulte et al., 2005). Aminosäuren in der C-terminalen Helix der Cyclin-Box-Struktur von Cyclin T1 beeinflussen ebenso die Interaktion (Dames et al., 2007). Die Konformation und die Orientierungen der Moleküle zueinander sind jedoch unklar. Für die strukturellen Untersuchungen wurden nach Analyse verschiedener Hexim1 Mutanten (Schonichen et al., 2010) das Konstrukt Hexim1 (255-359, Δ 316-318), kurz TBD(Δ stammer) und das Cyclinbox-umfassende Konstrukt von Cyclin T1 (1-272) ausgewählt.

Ergebnisse

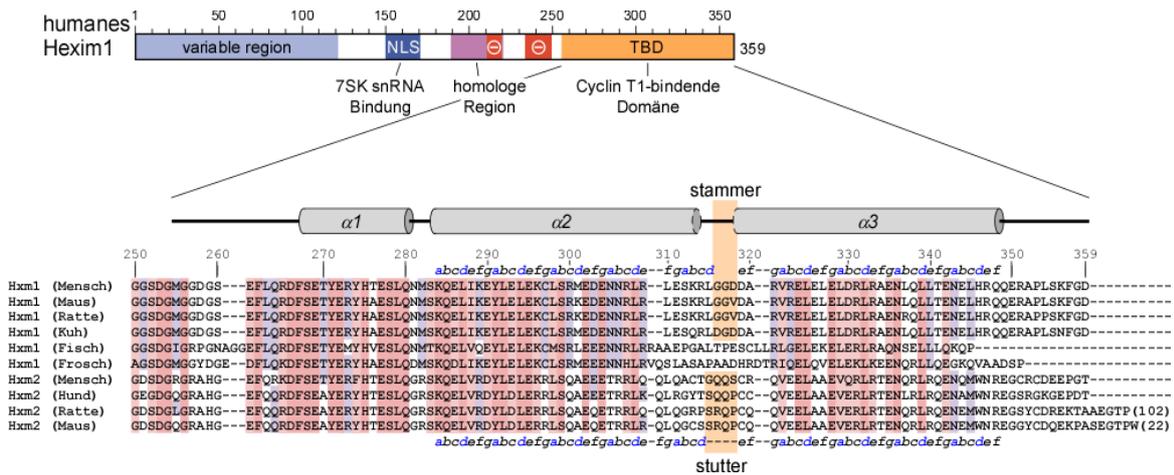


Abbildung 17: Alignment eukaryotischer Hexim-TBD Sequenzen und ihrer Sekundärstruktur. Die größte Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Proteinen liegt zwischen den Aminosäuren D266 und L308. Dieser Bereich umfasst die erste, den *coiled coils* vorgelagerte Helix $\alpha 1$, eine flexible Linkersequenz und den ersten Bereich der zweiten Helix $\alpha 2$. Die Buchstaben unterhalb der Sequenzen entsprechen den jeweiligen kanonischen Positionen in den Heptadwiederholungen. Auch der *stammer* ist in vier der Organismen konserviert, nur bei Fisch und Frosch ist das *coiled coil* kontinuierlich. Hexim2 weist an der identischen Stelle einen *stutter* auf, was die Insertion von vier Aminosäuren bedeutet.

3.1.1 Darstellung des Cyclin T1/Hexim1 TBD(Δ stammer) Komplexes

Die Hexim1 TBD(Δ stammer)-Mutante umfasst die Aminosäuren der TBD (255-359) mit Deletion der Reste 316-318, die für die Bildung eines *stammers* verantwortlich sind (siehe Abbildung 17 und Abschnitt 1.4.1). Durch die Deletion konnte die TBD deutlich stabilisiert werden, was durch thermale Denaturierungsexperimente überprüft wurde (Schonichen et al., 2010). Zusätzlich wurde dadurch allerdings die Bindung an Cyclin T1 geschwächt. Der K_d dieser Interaktion liegt bei $13,5 \mu\text{M}$, während der Wildtyp mit einem K_d von $2,3 \mu\text{M}$ bindet.

Cyclin T1 und Hexim1 TBD(Δ stammer) wurden als Fusionsproteine mit GST- bzw. Polyhistidinanker in *E.coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert. Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie und einer anschließenden Größenausschlusschromatographie. Zuvor wurden die Affinitätsanker mit Hilfe der TEV-Protease abgespalten. Bei Reinigung des Komplexes aus Cyclin T1 und Hexim1 TBD(Δ stammer) wurde der Schritt der Größenausschlusschromatographie für die Komplexbildung genutzt. Abbildung 18A zeigt den gereinigten Komplex sowie die gereinigten Einzelproteine Cyclin T1 und Hexim1 TBD(Δ stammer). Zur Überprüfung der Proteinidentität, wurden die Proben per ESI-MS analysiert.

Die Reinigung eines Selenomethionin-haltigen Hexim1 TBD(Δ stammer) Proteins erfolgte analog nach Expression in LeMaster Minimalmedium. Die Inkorporation des Selen wurde per ESI-MS-Analyse überprüft (siehe Abbildung 18B). Selen und Schwefel haben eine atomare Masse von 78,96 Da bzw. 32,02 Da. Ein Massengewinn des Selenomethionin-haltigen Proteins von ~ 143 Da zeigt daher, dass 3 Schwefelatome im Protein ausgetauscht wurden.

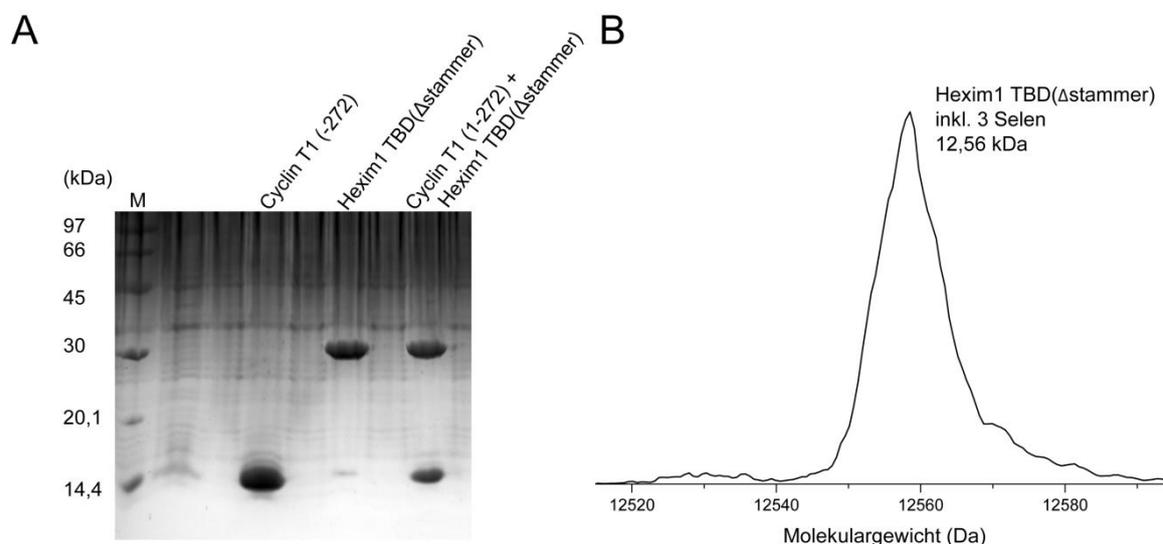


Abbildung 18: Darstellung des Cyclin T1/Hexim1 TBD(Δ stammer) Komplexes. (A) 18% SDS-PAGE Analyse des Cyclin T1/Hexim1 TBD(Δ stammer) Komplexes. (B) ESI-MS Analyse des Selenomethionin-haltigen Hexim1 TBD(Δ stammer). Der Austausch von drei Methioninen durch Selenomethionine konnte durch einen Massengewinn von ~ 143 Da bestätigt werden.

3.1.2 Kristallisation des Cyclin T1/Hexim1 TBD(Δ stammer) Komplexes

Ein initiales Screening zur Identifikation von möglichen Kristallisationsbedingungen wurde mit Hilfe der Qiagen Kristallisationsscreens bei 20°C und einer Proteinkonzentration von 20 mg/mL durchgeführt. Kleine Kristalle wuchsen nach etwa 10 Tagen in Bedingung 42 der Protein Complex Suite (0,1 M Natriumcacodylat pH 5,5, 0,1 M Calciumacetat, 12% (w/v) PEG 8000). Nach Optimierung der Bedingungen gelang es Kristalle zu züchten, die nach 7 Tagen bis zu einer Größe von 250 x 100 x 100 μm wuchsen (0,1 M Natriumcacodylat pH 5,5, 0,1 M Calciumacetat, 3-5% (w/v) PEG 8000, 5-10 mM Magnesiumchlorid; siehe Abbildung 19). Nach Zugabe von 30% (v/v) Ethylenglykol als Cryo-Schutzmittel wurden die Kristalle zunächst am institutseigenen Röntgengenerator getestet und anschließend an der Röntgenquelle X10SA am SLS, Villigen, gemessen. Die Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von 2,1 Å (siehe Tabelle 1). Anhand des Matthews Koeffizienten (V_M ; Kantardjief and Rupp, 2003) konnte man bereits sehen, dass nicht der Komplex, sondern nur eine der Komponenten im Kristall enthalten war. In der Annahme, dass sich ein Cyclin T1-Molekül in der asymmetrischen Einheit befand, betrug der V_M $1,77 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ mit einem Lösungsmittelanteil

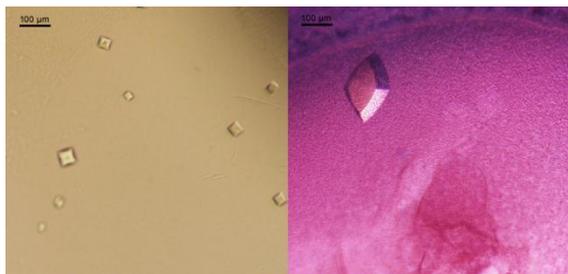


Abbildung 19: Initiale und optimierte Kristalle von Hexim1 TBD(Δ stammer). Die Kristallisationsbedingungen konnten so optimiert werden, dass Kristalle mit einer Größe von 250 x 100 x 100 μm gezüchtet werden konnten. In der optimierten Kristallbedingung ist zusätzlich zum Kristall Präzipitation zu erkennen.

von 30,7%. Wahrscheinlicher war es, dass ein Hexim1-Dimer in der asymmetrischen Einheit vorlag, da der V_M hier 2,29 $\text{\AA}^3/\text{Da}$ betrug und einen Lösungsmittelanteil von 46,4% vorwies. Ein Komplex aus beiden Proteinen fände durch seine Größe in dieser asymmetrischen Einheit keinen Platz.

Eine Lösung der Struktur mit molekularem Ersatz war nicht möglich, da kein geeignetes Modell zu Verfügung stand. Die Nutzung einer bekannten Cyclin T1 Kristallstruktur (pdb-Code: 2PK2) führte zu keiner Lösung, wodurch die Vermutung, dass ein Hexim1-Dimer im Kristall vorlag, unterstrichen wurde. Die NMR-Struktur der Hexim1 TBD(wt) lieferte auch keine Lösung, was zum Einen an der Deletion des *stammer*-Motivs lag, zum Anderen an den generellen Schwierigkeiten NMR-Strukturen als Suchmodell zu nutzen (Chen, 2001). Um das Phasenproblem dennoch zu lösen, wurde daher Selenomethionin-haltiges Hexim1 TBD(Δ stammer) produziert und für die Kristallisation verwendet. Diese Kristalle wuchsen in leicht abweichenden Bedingungen (0,1 M Natriumcacodylat pH 5,5, 0,09 M Calciumacetat, 1% (w/v) PEG 8000, 8 mM Magnesiumchlorid). Auch diese Kristalle wurden am SLS gemessen und die Struktur konnte unter Verwendung eines SAD-Datensatzes gelöst werden. Dazu wurden zunächst die Positionen der Selen mit dem Programm SHELXD bestimmt (Schneider and Sheldrick, 2002). Durch iterative Dichtemodifikationen mit dem Programm SHARP konnten dann die Phasen des Proteins bestimmt werden. Diese wurden anschließend auf den nativen Datensatz übertragen, da dieser die höhere Auflösung bot. Die asymmetrische Einheit des Kristalls enthielt ein Hexim1 TBD(Δ stammer)-Homodimer. Die Struktur konnte zu R-Faktoren von 0,24/0,30 (R_{work}/R_{free}) verfeinert werden. Eine vollständige Auflistung der Datenstatistiken ist in Tabelle 1 zu finden.

3.1.3 Struktur von Hexim1 TBD(Δ stammer)

Obwohl der Komplex aus Cyclin T1 und Hexim1 TBD(Δ stammer) für die Kristallisation verwendet wurde, war nur die Hexim1-Komponente im Kristall enthalten. Vermutlich präzipitierte Cyclin T1 im Laufe des Kristallisationsverfahrens, da in den Kristallisations-

tropfen zusätzlich Präzipitat beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 19). Nichtsdestotrotz war Cyclin T1 als eine Art Chaperon für den Kristallisationsvorgang notwendig, da Hexim1 TBD(Δ stammer) allein keine Kristalle ausbildete. Die Struktur zeigt, dass Hexim1 TBD(Δ stammer) ein kontinuierliches *coiled coil* mit 9 Heptadwiederholungen ausbildet ($\alpha 2/\alpha 3$: Reste 284-348; siehe Abbildung 20A). Durch Deletion des *stammer*-Motivs (316-318), welches die klassische *coiled coil*-Motivabfolge unterbrach, konnte die Konsensussequenz eines typischen *coiled coils* wieder hergestellt werden. Abbildung 20B zeigt das elektrostatische Oberflächenpotential des Proteins. Die TBD ist reich an polaren Resten, wodurch eine hohe thermale Stabilität des Proteins erreicht wird (Schonichen et al., 2010). Ein großer negativ geladener Bereich an der $\alpha 1$ - $\alpha 2'/\alpha 3'$ -Interaktionsfläche ist möglicherweise für die Interaktion mit Cyclin T1 verantwortlich.

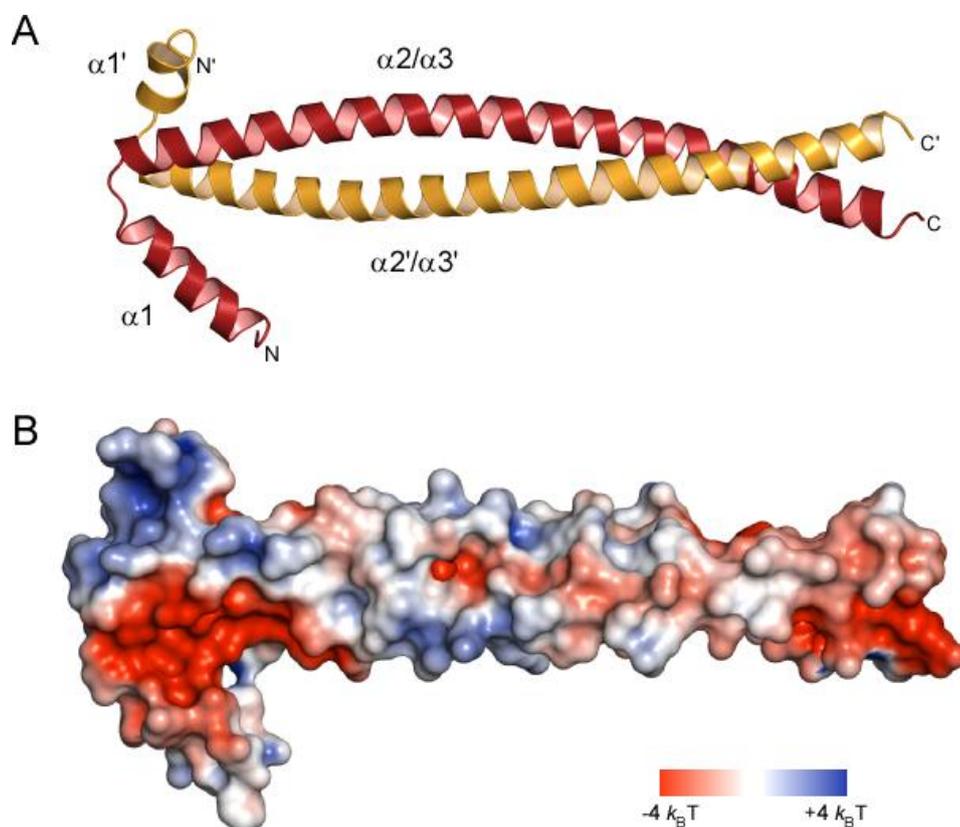


Abbildung 20: Darstellung der Hexim1 TBD(Δ stammer) Kristallstruktur. (A) *Cartoon*-Darstellung der Homodimerketten A (rot) und B (gelb). Helices $\alpha 2/\alpha 3$ und $\alpha 2'/\alpha 3'$ bilden ein kontinuierliches *coiled coil* bestehend aus 9 Heptadwiederholungen. Die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 1'$ sind dem *coiled coil* vorgelagert und interagieren wechselseitig mit $\alpha 2'/\alpha 3'$ bzw. $\alpha 2/\alpha 3$ der gegenüberliegenden Kette. (B) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials von Hexim1 TBD(Δ stammer) im Bereich von $-4 k_B T$ bis $+4 k_B T$. Die TBD ist sehr polar mit einem großen negativ geladenen Bereich an der $\alpha 1$ - $\alpha 2'/\alpha 3'$ -Interaktionsfläche. Die hohe Polarität hat vermutlich einen positiven Einfluss auf die Stabilität des Proteins (Schonichen et al., 2010).

Tabelle 1: Datenstatistiken zur Aufnahme und Verfeinerung des nativen und des Selenomethionin-haltigen Hexim1 TBD(Δ stammer) Kristalls.

	nativ	Selenomethionin
Datenaufnahme		
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA
Wellenlänge (Å)	0,97943	0,97887
Raumgruppe	I4	I4
Einheitszelle a, b, c (Å) α , β , γ (°)	a = b = 70,8; c = 91,0 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = b = 70,9; c = 91,0 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Auflösung (Å)*	45,50 – 2,10 (2,15 – 2,10)	18,0 – 3,20 (3,30 – 3,20)
Gemessene Reflexe	211.280 (22.837)	46.623 (3.996)
Einzigartige Reflexe	13.117 (1.700)	7.300 (621)
R_{merge}	0,085 (0,386)	0,061 (0,236)
Multiplizität	16,11 (13,43)	6,38 (6,43)
$\langle I/\sigma_I \rangle$	14,70 (3,55)	16,14 (6,69)
Vollständigkeit (%)	100,0 (100,0)	99,9 (100,0)
Verfeinerung		
Gesamtzahl der Atome	1.321	
Inhalt des Modells	paralleles Homodimer der Ketten: A: Hexim1 (266-350, Δ 316-318) B: Hexim1 (272-350, Δ 316-318)	
Anzahl der Wassermoleküle	51	
Lösungsmittelanteil (%)	46,4	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,236/0,296 (0,301/0,391)	
r.m.s.d. der Bindungen (Å)	0,021	
r.m.s.d. der Winkel (°)	2,031	
$\langle B \rangle$ Gesamt (Å ²)	31,8	
$\langle B \rangle$ Hexim1_A (Å ²)	38,2	
$\langle B \rangle$ Hexim1_B (Å ²)	25,2	
$\langle B \rangle$ Wasser (Å ²)	31,3	
Ramachandran plot	begünstigt: 93,5 % erlaubt: 6,5 %	
pdb Code	3S9G	

* Werte in Klammern entsprechen denen der höchsten Auflösungsschale.

$R_{\text{merge}} = \sum(|I - \langle I \rangle|) / \sum(I)$, mit I und $\langle I \rangle$ als die beobachteten und die mittleren Intensitäten aller Beobachtungen eines Reflexes, inklusive der Symmetrie-verwandten Äquivalente.

$R = \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$, mit F_{obs} und F_{calc} als die beobachteten und die berechneten Strukturaktoren des hkl Reflexes.

R_{free} wurde von einer zufällig ausgewählten Teilmenge der Reflexe (4,8%), welche während der Verfeinerung ausgelassen wurden, berechnet.

Dem *coiled coil* vorgelagert befinden sich zwei kleinere α -Helices (α_1 : Reste 266-281, α_1' : 272-281), wobei die Helix der Kette A (rot) besser aufgelöst ist. Diese beiden kleinen Helices interagieren über eine Reihe von Kontakten mit den jeweils gegenüberliegenden Helices α_2'/α_3' bzw. α_2/α_3 . Eine Reihe von ionischen Interaktionen stabilisiert die Interaktionen der Helices. So interagiert die Aminogruppe von Lys284' an

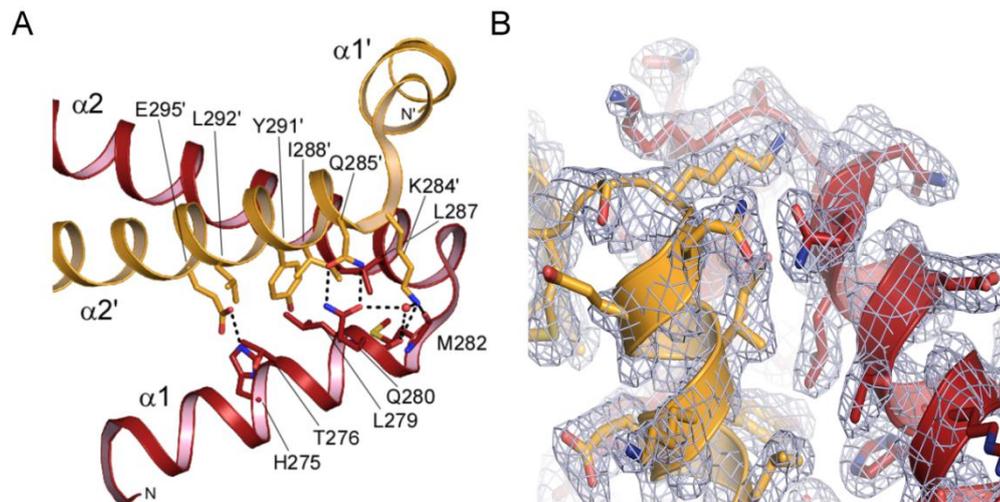


Abbildung 21: Ionische und hydrophobe Interaktionen zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2'/\alpha 3'$. (A) Cartoon-Darstellung der $\alpha 1$ - $\alpha 2'$ -Interaktion in Hexim1 TBD (Δ -stammer). Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. (B) Elektronendichte von Hexim1 TBD (Δ -stammer) für $\alpha 1$ - $\alpha 2'/\alpha 3'$ -Interaktion bei 2,1 Å. Es wird die 2F_o-F_c-Elektronendichte bei 1,0 σ dargestellt.

Position **a** in der ersten Heptadwiederholung von $\alpha 2'$ mit den Rückgrat-Carbonylgruppen von Gln280 und Met282 von $\alpha 1$ (siehe Abbildung 21A). Weiterhin lässt sich eine Interaktion zwischen den Seitenketten von Glu295' in $\alpha 2'$ und His275 in $\alpha 1$ erkennen. Zusätzlich werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gln285' in $\alpha 2'$ und Gln280 in $\alpha 1$ gebildet. Die Wechselwirkungen der beiden Helices werden neben den polaren Interaktionen durch hydrophobe Kontakte zwischen Leu279, Thr276 und Leu287 in $\alpha 1$ mit Ile288', Tyr291' und Leu292' in $\alpha 2'$ unterstützt. Diese Reste sind mit Ausnahme von Thr276, welches auch ein Alanin oder Valin sein kann, in Hexim1 hochkonserviert (siehe Abbildung 17). Daraus kann man schließen, dass dieses strukturelle Element in allen Spezies vorhanden ist, was möglicherweise Rückschlüsse auf eine konservierte Funktion zulässt.

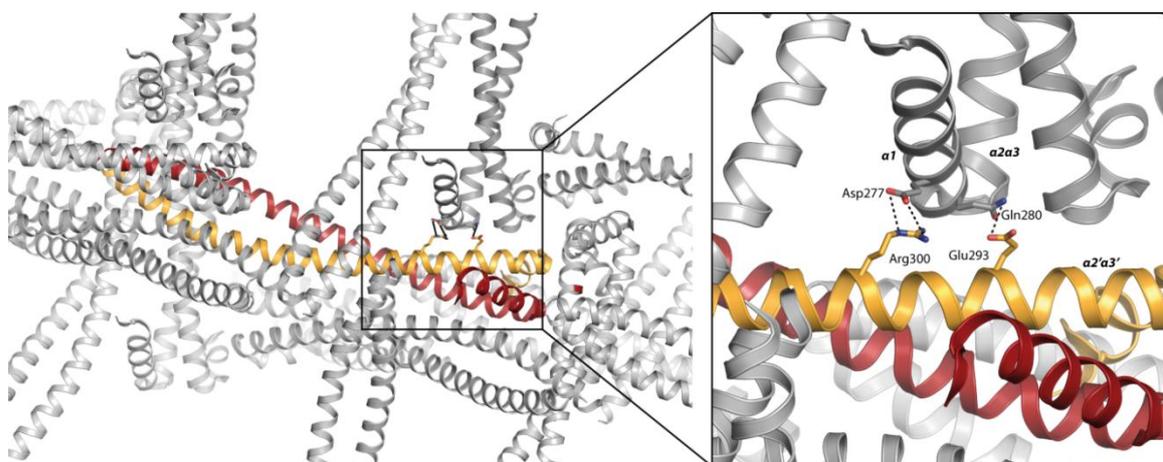


Abbildung 22: Kristallpackung von Hexim1 TBD (Δ -stammer). Die asymmetrische Einheit ist in rot und gelb dargestellt, die Symmetrie-verwandten Moleküle in grau. Es finden zahlreiche Interaktionen mit Nahbarmolekülen statt, wobei hier die ionische Interaktion zwischen den Seitenketten Glu293', Arg300' und Asp277 bzw. Gln280 gezeigt wird. Die Kristallpackung ist sehr dicht, wodurch die hohe Auflösung von 2,1 Å erklärt werden kann.

Weiterhin gibt es kristallographische Kontakte zwischen den Symmetrie-verwandten Molekülen im Kristall. So interagiert zum Beispiel Glu293 und Arg300 in $\alpha2/\alpha3$ mit Asp277 und Gln280 im Übergang von $\alpha1$ zu $\alpha2/\alpha3$ eines im Kristall benachbarten Moleküls (siehe Abbildung 22). Die vorgelagerte Helix $\alpha1$ in Kette B zeigt auf ein benachbartes Molekül, wodurch vermutlich eine Verkürzung der Helix bzw. eine schlechtere Auflösung von $\alpha1'$ im Vergleich zu Kette A zustande kommt. Durch diese und weitere kristallographischen Kontakte ergibt sich eine sehr enge Packung der Moleküle im Kristall, die durch den vergleichsweise niedrigen Matthew's Koeffizienten von $2,29 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ bestätigt wird. Diese multiplen Interaktionen eines recht sperrigen und starren Moleküls könnten eine Erklärung für die hohe Auflösung sein. Die Elektronendichte ist exemplarisch in Abbildung 23B dargestellt.

Wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben gehen *coiled coils* eine typische *knobs-into-holes* Packung ein (Lupas and Gruber, 2005). Dabei werden die Seitenketten der Reste an Positionen **a** und **d** von vier Resten der gegenüberliegenden Helix durch hydrophobe Kontakte eingefasst. Diese besondere Packung kann auch in der Hexim1 TBD(Δ stammer) Kristallstruktur beobachtet werden (siehe Abbildung 23A). Durch diese typischen Interaktionen werden die Orientierung und die Anzahl der Ketten in einer *coiled coil*-Struktur bestimmt. Für die Reste an den Positionen **d** sind die speziellen, hydrophoben Interaktionen deutlich zu beobachten. Es befinden sich ausschließlich

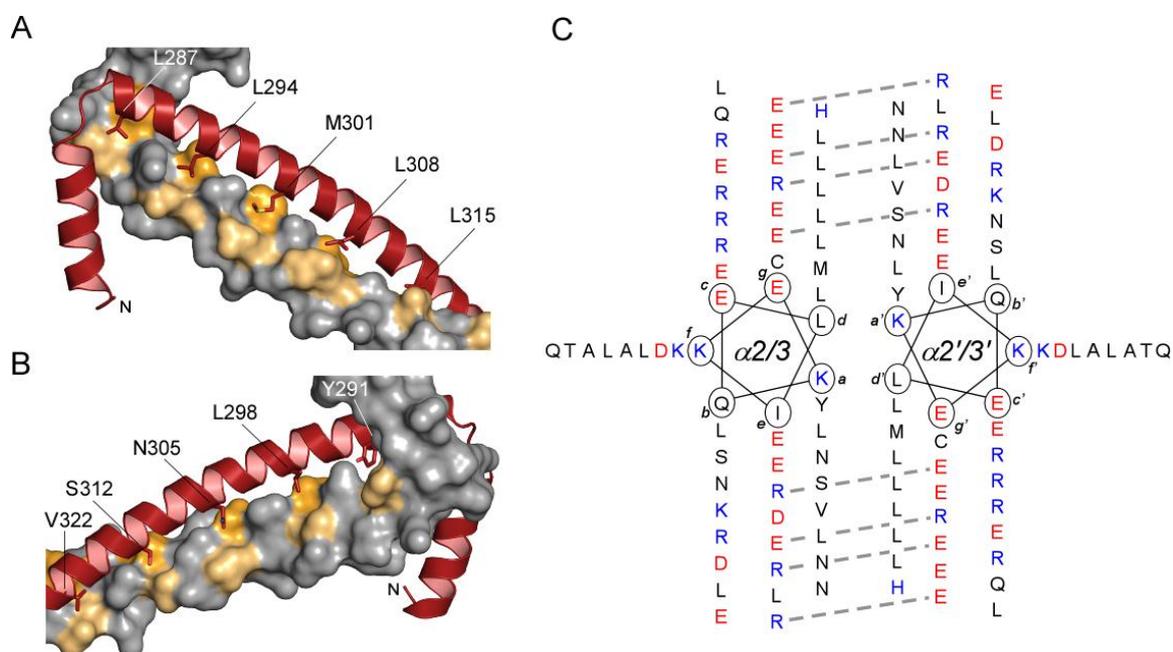


Abbildung 23: Knobs-into-holes Packung. (A+B) Darstellung der Seitenketten der Reste an Positionen **d** und **a** in den ersten 5 Heptadwiederholungen. Die gegenüberliegende hydrophobe Tasche (Reste an Positionen **d'** und **e'** bzw. **g'** und **a'**) ist in gelb/ocker dargestellt. (C) Schematische Darstellung der Heptadwiederholungen der Hexim1 TBD(Δ stammer) Struktur mit den Positionen **a** bis **g**. Salzbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Positiv geladene Aminosäuren sind in blau, negativ geladene Aminosäuren in rot zu sehen.

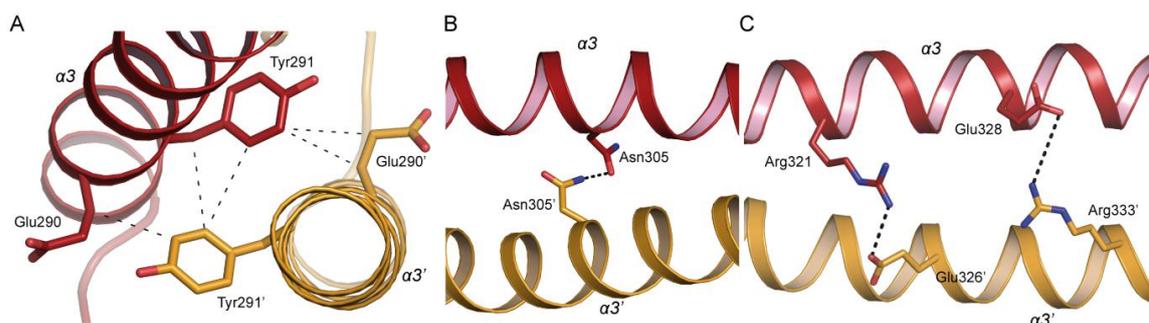


Abbildung 24: Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Kette A und B. (A) Tyr291 ist ein untypischer Rest an Position **a** bzw. **a'** der Heptadwiederholungen. Dennoch finden hydrophobe Interaktionen zwischen beiden Tyrosinen und den benachbarten Glutamaten statt. (B) Ionische Wechselwirkung zwischen Asn305 und Asn305'. (C) Interaktionen der Reste an Positionen **e** und **g**. Diese Wechselwirkungen bestimmen die Periodizität des *coiled coils*.

Leucine und ein Methionin an den Interaktionsflächen, wodurch starke hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden können. Für die Reste an den **a**-Positionen gilt dieses nicht, hier finden sich auch ein Asparagin und ein Tyrosin (siehe Abbildung 24A-B). Die Kontakte werden aber dennoch nicht behindert. Das Tyr291 befindet sich nahe des Übergangs von der α_2/α_3 zur α_1 -Helix. Die Hydroxylgruppen beider Tyrosine der Ketten A und B sind dabei Lösungsmittel-exponiert, während die Kohlenstoffe der Benzolringe hydrophobe Kontakte mit Glu290 und dem jeweils gegenüberliegenden Tyr291 ausbilden. Das Carbonylsauerstoff von Asn305 interagiert mit der Aminogruppe von Asn305' und bildet somit eine starke Interaktion, die allerdings im Gegensatz zu den typischen hydrophoben Interaktionen steht. Die Berührungsfläche der Ketten A und B umfasst eine Größe von 1958 \AA^2 , welches ein Viertel der gesamten Oberfläche einer Kette darstellt. Interessanterweise sind dabei die untypischen Reste an Position **a** Lys281 und Tyr291 von allen Aminosäuren mit einer Fläche von über 100 \AA^2 am meisten verborgen. Diese enge Packung stimmt gut mit den Ergebnissen der thermalen Denaturierung überein (Schonichen et al., 2010), bei der die Schmelztemperatur im Vergleich zur TBD(wt) von 66°C auf 75°C erhöht war. Dies bedeutet, dass das Protein durch die Deletion des *stammers* deutlich stabilisiert werden konnte.

Geladene Aminosäuren an den **e**- bzw. **e'**- und **g**- bzw. **g'**-Positionen interagieren in einem *coiled coil* miteinander und stabilisieren die Dimerisierung. Diese Salzbrücken sichern die Spezifität der Heptad-Periodizität durch alternierende Polarität. In der vorliegenden Struktur können in der Tat auch solche intermolekularen, ionischen Wechselwirkungen beobachtet werden (siehe Abbildung 24C). Arg333' in α_2' interagiert dabei beispielsweise mit Glu328 in α_2 und Glu326' in α_2 mit Arg321 α_2 .

3.1.4 Geometrische Analyse von Hexim1 TBD und Hexim1 TBD(Δ stammer)

Eine genaue Analyse der geometrischen Parameter der *coiled coil* Struktur und ein Vergleich dieser Parameter mit der TBD(wt) wurden mit dem Programm TWISTER

durchgeführt (Strelkov and Burkhard, 2002). Dabei konnten die Ganghöhe des *coiled coils*, der Radius, die Crickschen Phasen, der *coiled coil* Phasengewinn pro Rest und der α -helikale Phasengewinn pro Rest berechnet werden. Eine Übersicht über die Parameter ist in Abbildung 25 gegeben. Die Ganghöhe beschreibt eine vollständige Umdrehung des *coiled coils*. In einer idealen Struktur beträgt die Ganghöhe 140 Å (siehe Abbildung 25A). Der Radius ist der Abstand zwischen der *coiled coil* Achse und dem Mittelwert der α -helikalen Achsen. Die Crickschen Phasen definieren die Position jedes Rests relativ zur *coiled coil* Achse (siehe Abbildung 25B). Dabei wird der Winkel zwischen dem jeweiligen C_{α} -Atom, der *coiled coil*-Achse und der α -helikalen Achse betrachtet. Der *coiled coil* Phasengewinn pro Rest beschreibt den Anteil jedes Rests an der *coiled coil* Phase. Theoretisch sind das $\sim 5^{\circ}$, da 72 Reste eine vollständige Phase (360°) bilden. Bei linksdrehenden *coiled coils* ist dieser Wert negativ. Der α -helikale Phasengewinn pro Rest beschreibt den Anteil jedes Rests an der α -helikalen Phase (nicht abgebildet). Theoretisch sind dies $\sim 103^{\circ}$, da 3,5 Reste eine vollständige Phase von 360° ergeben.

Die Anwesenheit des *stammers* führt zu einer lokalen Störung der *coiled coil* Geometrie. Abbildung 26 zeigt die geometrischen Parameter im Vergleich. Eine vollständige Auflistung der berechneten Parameter befindet sich in Tabelle 3 in Abschnitt 7.2.

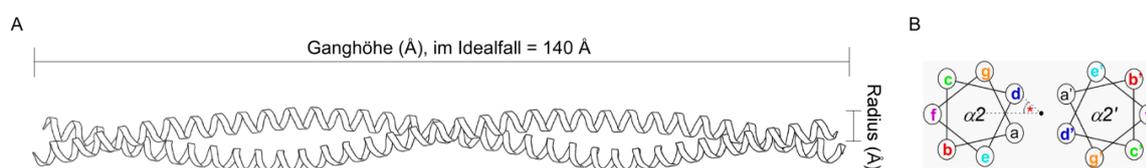


Abbildung 25: Geometrische Parameter einer *coiled coil*-Struktur. (A) Ganghöhe und Radius (pdb-Code: 2EFR). (B) Die Berechnung der Crickschen Phasen (*) erfolgt über die Position jedes Rests relativ zur *coiled coil* Achse. Dabei wird der Winkel zwischen dem jeweiligen C_{α} -Atom, der *coiled coil*-Achse und der α -helikalen Achse betrachtet.

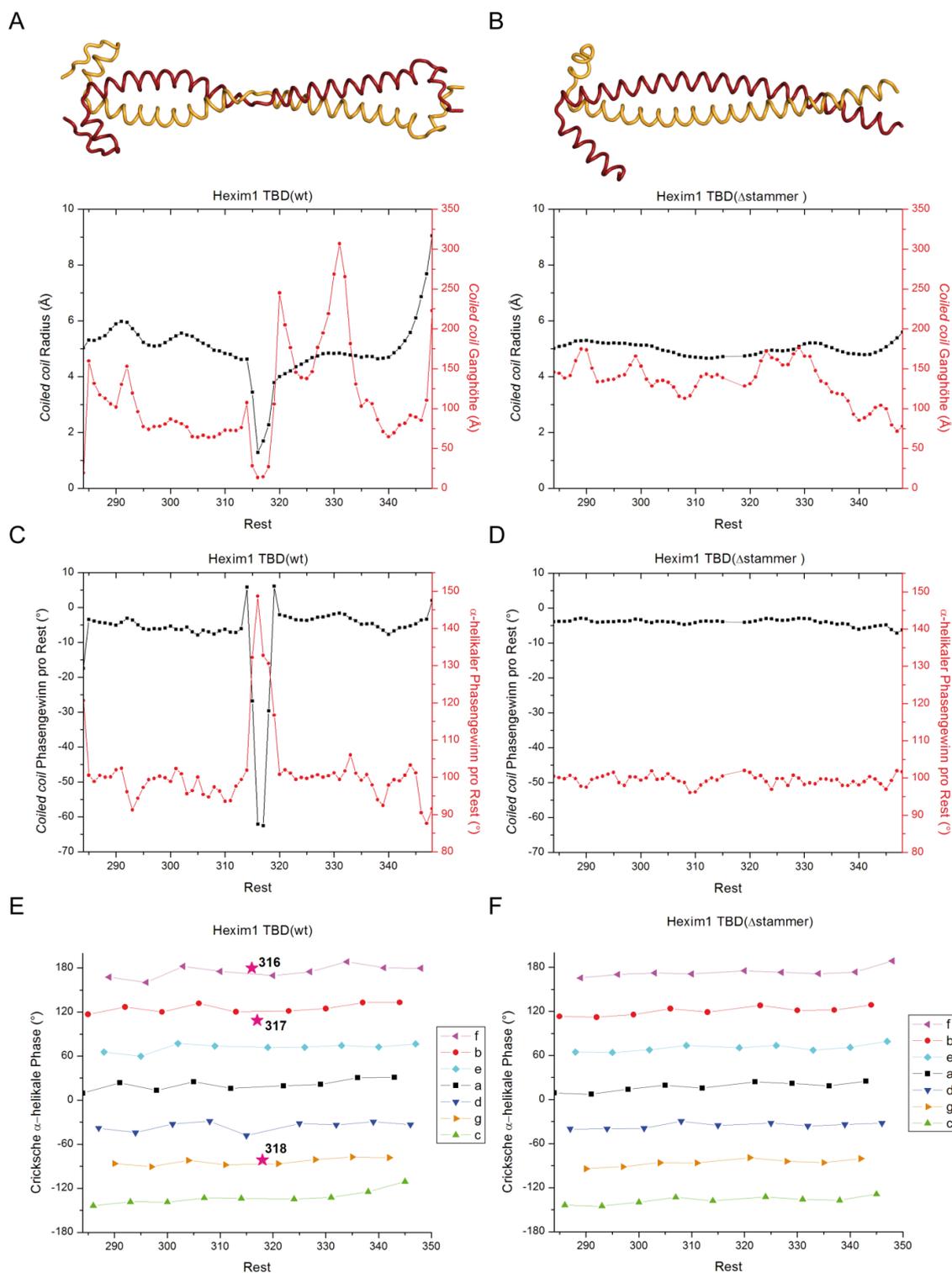


Abbildung 26: Ergebnisse der TWISTER-Analyse von Hexim1 TBD(wt) und TBD(Δstammer). (A-B) Übersicht über Radius (schwarz) und Ganghöhe (rot). (C-D) Darstellung des α -helikalen Phasengewinns pro Rest (rot) und des *coiled coil* Phasengewinns pro Rest (schwarz). (E-F) Cricksche α -helikale Phasen für Positionen a-g.

Während Radius und Ganghöhe (siehe Abbildung 26A-B) für Hexim1 TBD(wt) im Bereich des *stammer*-Motivs (Reste 316-318) stark vom Optimum abweichen (Ganghöhe <50 Å, Radius <1 Å), kann man bei Hexim1 TBD(Δstammer) stabile Werte

für beide Parameter beobachten. Nur im Bereich des C-Terminus, wo sich die Ketten teilweise entwinden, weichen die Werte etwas ab. Die starke Verminderung der Werte bei dem wildtyp Protein ist ein Zeichen für eine Überdrehung des *coiled coils* nahe des Bereichs des *stammer*-Motivs. Eine vollständige Umdrehung wäre hier schon nach kurzer Distanz erreicht. Ebenso ist der Radius erheblich erniedrigt, da die Ketten aufgrund zweier aufeinanderfolgender Glycine (316-317) sehr eng umeinander gewunden sind. Bei der TBD(Δ stammer) Mutante sind die Werte für die Ganghöhe im Durchschnitt etwas erniedrigt (~ 134 Å). Durch die Deletion der Reste 316-318 wurde also ein nahezu perfektes *coiled coil* geschaffen, dessen Länge einer vollständigen Umdrehung im Vergleich zu z.B. Tropomyosin etwas erhöht ist.

Durch die Überdrehung des *coiled coils* in der TBD(wt) wird der Betrag des *coiled coil* Phasengewinns im Bereich des *stammers* deutlich erhöht (siehe Abbildung 26C-D). Das bedeutet, dass in diesem Bereich wesentlich weniger Reste für eine vollständige *coiled coil* Phase notwendig sind. In diesem Bereich würden etwa 6 Reste für eine vollständige Umdrehung von 360° ausreichen. Im Gegensatz dazu ist der α -helikale Phasengewinn hier deutlich erhöht. Die Faltung entspricht in diesem Bereich also nicht mehr einer typischen α -Helix. Diese α -helikale Überdrehung führt dazu, dass nur etwa 2,5 Reste für eine α -helikale Umdrehung nötig wären. Beide Phasen haben eine vergleichbare Höhe bzw. Tiefe, woraus man schließen kann, dass die superhelikale Überdrehung und α -helikale Überdrehung zu etwa gleichen Anteilen stattfindet. In der TBD(Δ stammer)-Mutante gibt es solche Unregelmäßigkeiten nicht. Die Werte stimmen sehr gut mit den theoretischen Werten für ein perfektes *coiled coil* überein. Für den α -helikalen Phasengewinn ergibt sich ein Durchschnittswert von $\sim 99^\circ$, welcher etwas vom Optimum von 103° abweicht. Die Werte für den *coiled coil* Phasengewinn liegen durchschnittlich bei -4° gegenüber den theoretischen -5° .

Die Crickschen Phasen beschreiben die Position jedes Rests relativ zur *coiled coil*-Achse. Jede der sieben Positionen **a-g** hat eine typische Cricksche Phase, die den Winkel zwischen der *coiled coil* Achse, des jeweiligen C_α -Atoms und der α -helikalen Achse beschreibt. So liegen die Winkel der **a**- und **d**-Positionen nahe 0° , da diese Reste der zentralen Achse am nächsten sind (siehe Abbildung 25). Die Reste innerhalb des *stammers* sind in Abbildung 26E als Sterne dargestellt, da sie nicht in das typische Muster passen. Rest 316 befindet sich beispielsweise an einer Position, die typisch für einen Rest an Position **f** ist, obwohl sich Rest 316 an einer **e**-Position befinden sollte. Ähnliche Abweichungen findet man bei Resten 317 und 318. Bei der Mutante findet man wiederum keine solchen Abweichungen (siehe Abbildung 26F), alle Reste befinden sich an den für sie typischen Positionen.

Durch die geometrische Analyse von Hexim1 TBD(Δ stammer) und der Vergleich mit Hexim1 TBD(wt) konnte gezeigt werden, dass die Deletion der Reste 316-318 zu einer Regularisierung der *coiled coil*-Struktur führte. Dabei wurde eine Stabilisierung des Proteins erreicht, die auch in biochemischen Experimenten bestätigt werden konnte (Schonichen et al., 2010).

3.2 Strukturelle Untersuchung von P-TEFb/Hexim1

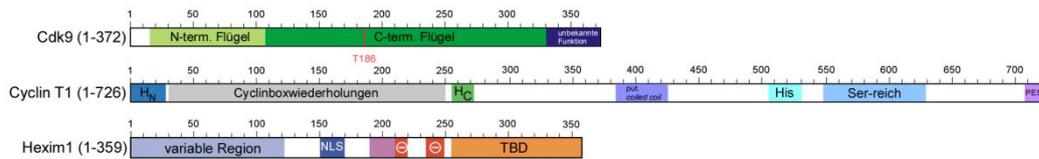
Die Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 wird durch Hexim1 und 7SK snRNA vermittelt. 7SK allein hat keinen Einfluss auf die Inaktivierung, verstärkt jedoch die Inhibition durch Hexim1 (Czudnochowski, 2009). Hexim1 allein ist in der Lage, die Cdk9-Aktivität um ~80% zu vermindern. Derzeit gibt es keine strukturellen Informationen zur Art der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1. Ein PYNT-Motiv (202-205) ist vermutlich direkt an der Inhibition beteiligt (Czudnochowski, 2009; Michels et al., 2003). Daher sollte die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb durch Aufklärung der Struktur näher untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Komplexe, bestehend aus Cdk9 (1-330), Cyclin T1 (1-259) und Hexim1 (194-316 oder 194-359) präpariert. Ein Komplex bestehend aus Cdk9 (1-340), Cyclin T1 (1-272) und Hexim1 (194-359) wurde zuvor in Zusammenarbeit mit Dr. Nadine Czudnochowski für strukturelle Untersuchungen verwendet, lieferte aber keine für die Datenaufnahme brauchbaren Kristalle (Czudnochowski, 2009). Baculovirus mit den Konstrukten Cdk9 (1-330) und Cyclin T1 (1-259) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Louise Johnson, Oxford, bereitgestellt.

3.2.1 Darstellung der P-TEFb/Hexim1 Komplexe

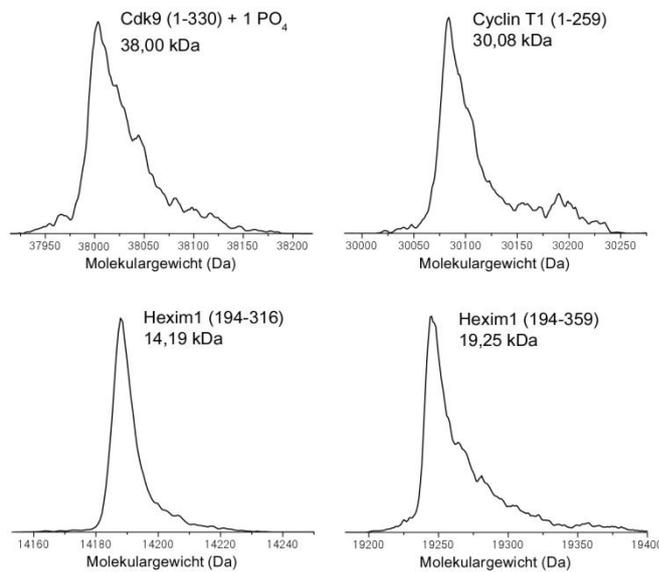
Der P-TEFb-Komplex aus Cyclin T1 und Cdk9 wurde in Baculo-infizierten Insektenzellen (*Sf21*) koexprimiert und zusammen mit Hexim1 gereinigt. Die Hexim1-Konstrukte wurden zuvor als GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. GST-Hexim1 (194-316) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert, da dieses Hexim1-Konstrukt ohne den Löslichkeitsanker anfällig für Degradation war. Nach Komplexbildung mit P-TEFb konnte der Anker entfernt werden. Das längere Hexim1-Konstrukt, GST-Hexim1 (194-359), konnte über Nacht mithilfe der TEV-Protease verdaut und anschließend über Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt werden. Die Lagerung erfolgte auch bei -80°C. Die so präparierten Hexim1-Konstrukte wurden vor der Zellyse zu dem Insektenzellen-Pellet gegeben und anschließend über GSH-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie

Ergebnisse

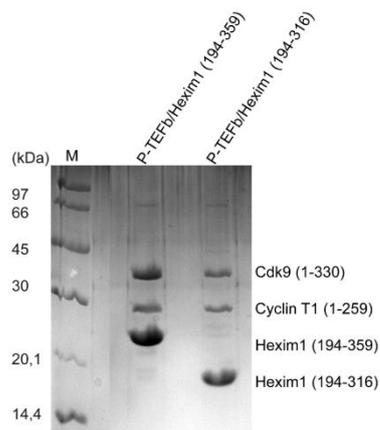
A



B



C



D

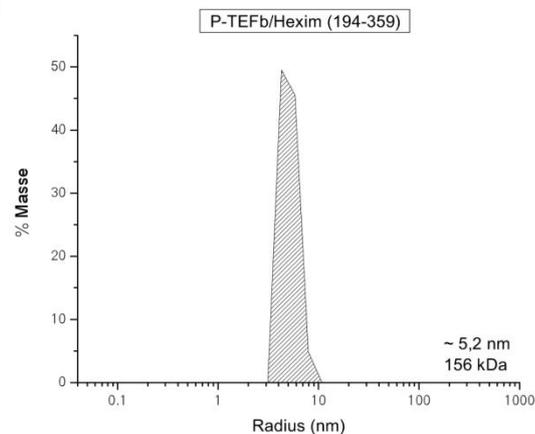


Abbildung 27: Darstellung des P-TEFb/Hexim1 Komplexes. (A) Domänenarchitektur von Cdk9, Cyclin T1 und Hexim1. (B) ESI-MS der Komplexuntereinheiten Cdk9 (1-330), Cyclin T1 (1-259), Hexim1 (194-359) und Hexim1 (194-316). Bei Cdk9 konnte man einen Massenzuwachs von 80 Da beobachten, was mit dem Molekulargewicht einer Phosphorylierungsgruppe übereinstimmt. (C) 18% SDS-PAGE der P-TEFb/Hexim1 Komplexe. (D) DLS-Messung von P-TEFb/Hexim1 (194-359). Die Probe ist monodispers und es konnte ein mittlerer Radius von 5,2 nm berechnet werden. Dies entspricht einem theoretischen Molekulargewicht von ~156 kDa, wenn man von einem globulären Komplex ausgeht. Die Masse stimmt mit der berechneten und der per ESI-MS bestimmten Masse von P-TEFb/Hexim1 (194-359) in etwa überein (106,6 kDa).

mit P-TEFb kogereinigt. Abbildung 27C zeigt die gereinigten Komplexe in der SDS-PAGE Analyse. Die Komplexe sind von hoher Reinheit (>95%), wobei Hexim1 (194-359) im Überschuss ist. Dies passt zu biochemischen Daten, die besagen, dass dieses Proteinkonstrukt als Dimer im Komplex vorliegt (Schonichen et al., 2010). Die ternären

Komplexe konnten auf 2-7 mg/mL konzentriert werden und waren damit für biochemische und strukturelle Analysen geeignet.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Proteinkomplexe per ESI-MS auf ihre Identität und den Phosphorylierungsstatus von Cdk9 überprüft (siehe Abbildung 27B). Cdk9 war vollständig einfach phosphoryliert, da nur ein Peak bei 38,00 kDa beobachtet werden konnte, der einem Massenzuwachs von 80 Da zur berechneten, theoretischen Masse von 37,92 kDa entspricht. Hierbei wird davon ausgegangen, dass es sich um die Phosphorylierung des Thr186 in der Aktivierungsschleife handelt, da in funktionalen Assays gezeigt werden konnte, dass derart gereinigtes P-TEFb Substrataktivität besitzt (Czudnochowski, 2009).

Es wurden DLS-Messungen der Komplexe durchgeführt, um die Dispersität der Proben zu überprüfen. Beispielhaft ist in Abbildung 27D die Messung für den P-TEFb/Hexim1 (194-359) Komplex gezeigt. Die Berechnung des hydrodynamischen Radius des Komplexes ergab 5,2 nm, welches einer theoretischen Masse von ~156 kDa im Falle eines globulären Proteins entspricht. Die per ESI-MS ermittelten Massen der Proteinkomplex-Untereinheiten entsprachen zusammen 106,6 kDa unter der Annahme, dass Hexim1 als Dimer im Komplex vorhanden ist. Dieser Wert stimmt mit den DLS-Messungen im Rahmen der Fehlergenauigkeit annähernd überein. Für den P-TEFb/Hexim1 (194-316) Komplex wurde ein Radius von 4,7 nm und dementsprechend ein Molekulargewicht von ~127 kDa ermittelt (siehe Abschnitt 7.3). Auch diese Werte stimmen in etwa mit der per ESI-MS ermittelten Masse von 82,3 kDa überein. In diesem Komplex wird aufgrund von bestehenden Daten angenommen, dass Hexim1 als Monomer gebunden ist (Schonichen et al., 2010), da die Dimerisierungsdomäne (319-359) in diesem Konstrukt nicht vorhanden ist. Zusätzlich konnte durch die DLS-Messungen gezeigt werden, dass die Komplexe nicht aggregiert sind, sondern ausschließlich monodispers vorliegen.

3.2.2 Strukturelle Untersuchungen des P-TEFb/Hexim1 Komplexes

Zunächst wurden die Komplexe für Kristallisationsexperimente verwendet. Initiale Kristalle des Cdk9 (1-330)/Cyclin T1 (1-259)/Hexim1 (194-359)-Komplexes wuchsen nach zwei Wochen im Qiagen PACT-Screen, Bedingung 81 (0,2 M Kalium-/Natriumtartrat, 0,1 M Bis-Tris-propan pH 7,5, 20% (w/v) PEG 3350; siehe Abbildung 28). Die Kristalle konnten im 24-Loch Format reproduziert werden, allerdings wuchsen diese nicht über eine Größe von ~15 µm hinaus. Damit waren sie für Datenaufnahmen leider ungeeignet. Der Komplex mit der verkürzten TBD, bestehend aus Cdk9 (1-330), Cyclin T1 (1-259) und Hexim1 (194-316) kristallisierte nach wenigen Tagen in Bedingung 16 des Qiagen JCSG Core II screens (0,1 M Imidazol pH 8,0, 0,2 M Magnesiumchlorid,

35% (v/v) MPD). Diese Kristallbildung konnte nicht reproduziert werden. Eine Kristallstruktur des inhibierten P-TEFb-Komplexes konnte daher bis zu diesem Zeitpunkt nicht ermittelt werden.



Abbildung 28: Kristallisation von P-TEFb/Hexim1. (A-B) Kristalle des P-TEFb/Hexim1 (194-359)-Komplexes. (A) zeigt die initialen Kristalle im Kleinlochformat und B die reproduzierten Kristalle. (C) Kristalle des P-TEFb/Hexim1 (194-316)-Komplexes im Kleinlochformat. Diese Kristallbildung konnte nicht reproduziert werden.

Um dennoch strukturelle Informationen über die P-TEFb-Hexim1 Interaktion zu erlangen, wurden die Komplexe per Kleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. Diese Messungen fanden am EMBL in Hamburg in Kooperation mit Prof. Dr. Dmitri Svergun, Dr. Weifeng Shang und Dr. Clement Blanchet statt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Komplexe eingesetzt und untersucht, um eine konzentrationsabhängige Aggregation auszuschließen. Durch Abzug des Streusignals der Pufferprobe konnten *ab initio* Berechnungen des Komplexes aus P-TEFb und Hexim1 (194-359) durchgeführt werden. Eine *ab initio* Strukturbestimmung des kompakteren Komplexes mit Hexim1 (194-316) ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Abbildung 29A zeigt die Volumenkarte der *ab initio* berechneten Struktur des minimal inhibierten P-TEFb Komplexes mit dem größeren beider Hexim1-Konstrukte (194-359). Die experimentelle Streukurve wird in Abbildung 29B mit der berechneten Streukurve des Modells verglichen. Das Modell konnte dadurch validiert werden, da es zu keiner nennenswerten Abweichung von der experimentellen Streukurve kommt. Die bekannten Kristall- und NMR-Strukturen von P-TEFb und Hexim1 TBD(wt) konnten bisher nicht durch eine automatisiertes *rigid body* Modellierungsverfahren in die Volumenkarten angepasst werden. Abbildung 29C zeigt die Strukturen als Bändermodell zum Vergleich im gleichen Maßstab. Die Ausstülpung der berechneten SAXS-Struktur könnte das C-terminale Segment der Hexim1 TBD beherbergen, während der globuläre Teil sowohl P-TEFb als auch den inhibierenden N-terminalen Bereich erfassen könnte. Weitere Berechnungen und strukturelle Analysen sind allerdings notwendig, um dies zu bestätigen und um den Inhibitionsmechanismus zu klären.

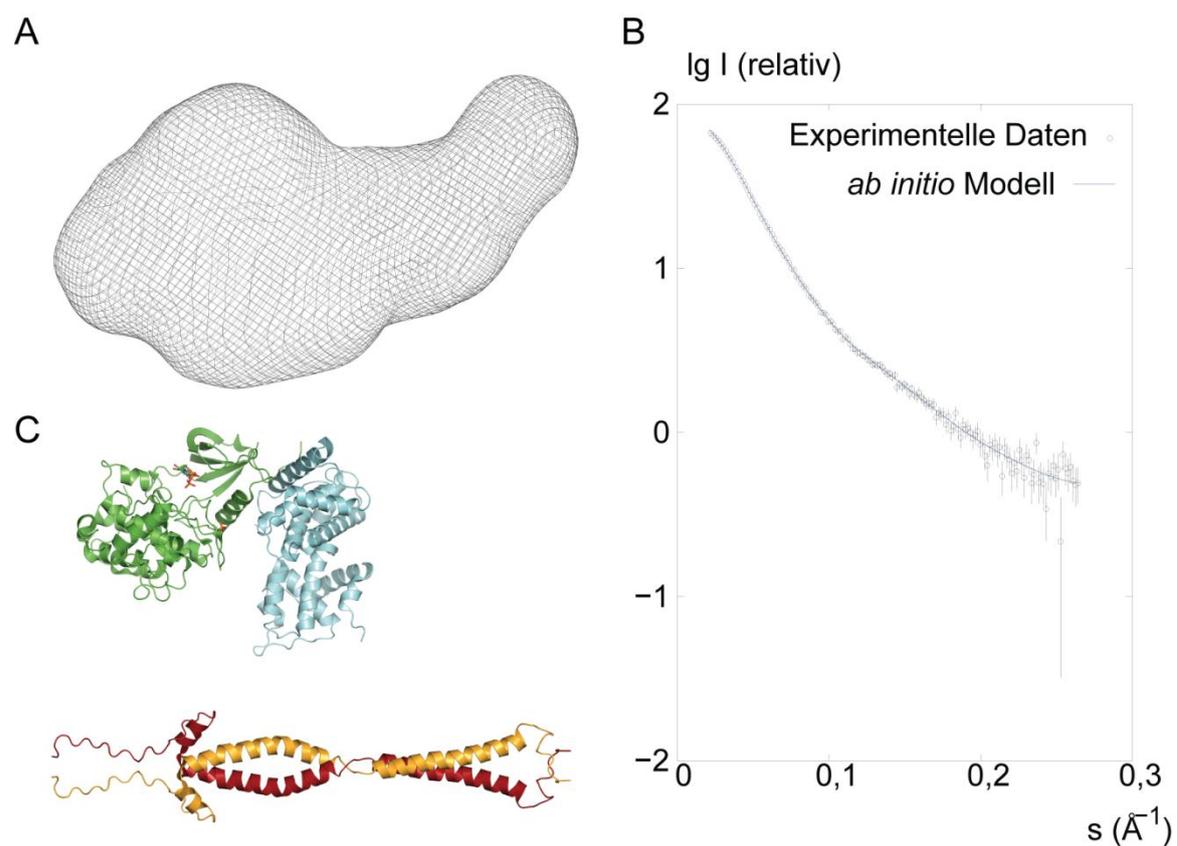


Abbildung 29: SAXS-Analyse des P-TEFb/Hexim1 (194-359) Komplexes. (A) Volumenkarte der *ab initio* berechneten Struktur des Komplexes. Das *ab initio* Modell wurde mit dem Programm DAMMIF erstellt (Franke and Svergun, 2009). Die Datenprozessierung erfolgte durch Dr. Weifeng Shang, EMBL Hamburg. Die Volumenkarte ist bei $\sigma = 1,0$ dargestellt. (B) Vergleich der Streukurve von P-TEFb/Hexim1 (194-359) mit der berechneten Streukurve des *ab initio* Modells. Beide Kurven stimmen miteinander überein. (C) Kristallstruktur von P-TEFb mit gebundenem ATP und NMR-Struktur des Hexim1 TBD(wt) (pdb-Codes: 3BLQ, 2GD7; Baumli et al., 2008; Dames et al., 2007).

3.3 Larp7 und die Interaktion mit 7SK snRNA

Als weitere Bestandteile des 7SK snRNPs sollten Larp7 und die 7SK snRNA und ihre Interaktion miteinander näher untersucht werden (siehe Abbildung 30A-B). Dazu wurde zunächst Larp7 (24-555) nach dem von Dr. Friederike Itzen entwickelten Protokoll exprimiert und gereinigt (siehe Abbildung 30C; Vollmuth, 2010). Zur Analyse der Dispersität wurden auch mit dieser Probe DLS-Messungen durchgeführt (siehe Abbildung 30D). Das Ergebnis der DLS-Messung mit einem hydrodynamischen Radius

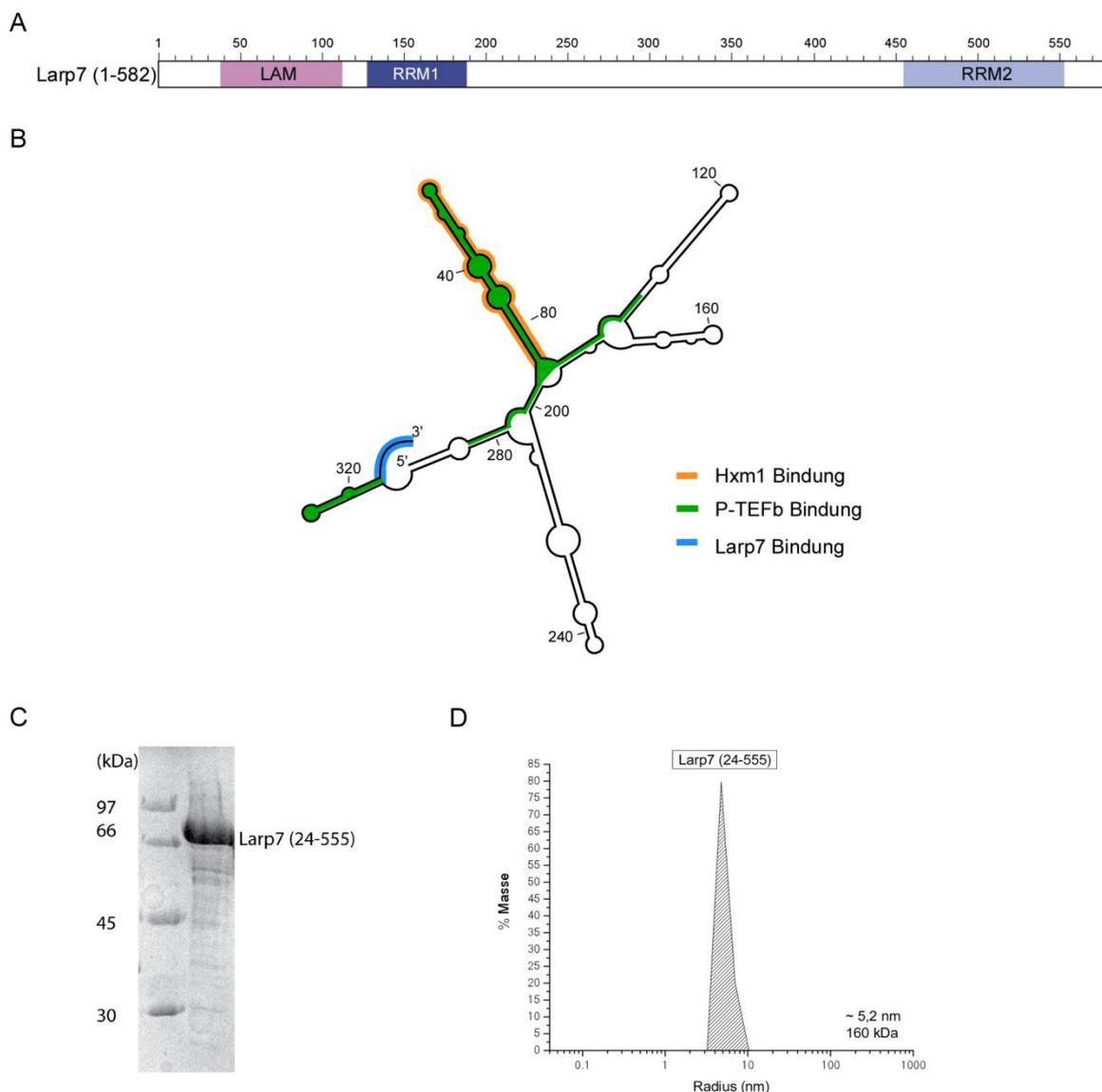


Abbildung 30: Darstellung von Larp7 und 7SK snRNA. (A) Domänenarchitektur von Larp7. Die RNA-bindenden Domänen LAM, RRM1 und RRM2 sind gekennzeichnet. (B) 7SK snRNA Strukturvorhersage mit mFold. Die Hexim1-, P-TEFb- und Larp7-bindenden Bereiche sind gekennzeichnet. (C) 18% SDS-PAGE von Larp7 (24-555). (D) DLS-Messung von Larp7 (24-555). Das ermittelte Molekulargewicht von 160 kDa liegt deutlich über dem theoretischen Molekulargewicht von 61 kDa. Möglicherweise bildet das Protein in Lösung ein Multimer aus oder der hydrodynamische Radius konnte aufgrund einer eher elongierten Struktur von Larp7 nicht korrekt berechnet werden.

von 5,2 nm und einem berechneten Molekulargewicht von 160 kDa ist in Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten analytischen Gelfiltrationsexperimenten (Vollmuth, 2010). Auch hier wurde eine Masse von 150 kDa ermittelt. Diese deutliche Abweichung vom theoretischen Molekulargewicht von 61 kDa könnte darauf hinweisen, dass das Protein in Lösung multimerisiert ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der hydrodynamische Radius aufgrund einer elongierten Struktur von Larp7, die im Wesentlichen aus einer Aneinanderreihung von RNA-bindenden Domänen besteht, nicht korrekt berechnet werden konnte. Weitere Experimente sollten Aufschlüsse über diese Diskrepanz geben.

Rekombinante 7SK snRNA wurde von Frau Karin Vogel-Bachmayr präpariert. Vor Verwendung der RNA war es essentiell, diese für 2 min bei 80°C zu erhitzen und anschließend kontrolliert und langsam abkühlen zu lassen, um eine korrekte Faltung zu gewährleisten. Abbildung 31 zeigt analytische Gelfiltrationsexperimente mit der 7SK snRNA, jeweils mit und ohne vorheriges Aufheizen im Vergleich. Man kann deutlich erkennen, dass die unbehandelte RNA zusätzliche multiple Aggregate bildet, während die aufgeheizte RNA einen monodispersen Peak zeigt. Der zusätzliche Peak bei 1,35 kDa deutet auf einzelne Nukleotide hin, die bei der Präparation der RNA nicht entfernt werden konnten. Das Molekulargewicht der 7SK liegt bei 106,5 kDa, jedoch eluiert die RNA bei etwa 250 kDa. Der verwendete Größenstandard basiert auf Proteinen verschiedener Größen, jedoch besitzt RNA eine andere molekulare Dichte als Proteine und daher kann mit dieser Methode keine Aussage über den

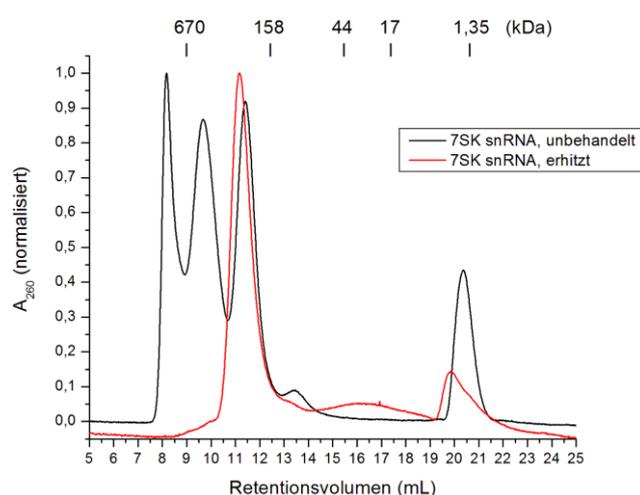


Abbildung 31: Analytische Gelfiltration mit 7SK snRNA. Die Absorption wurde bei 260 nm detektiert. Man kann deutlich erkennen, dass die zuvor erhitzte RNA (rot) einen monodispersen Peak bei ~250 kDa aufweist, während die unbehandelte RNA zusätzliche Aggregate bildet (schwarz). Der Peak bei 1,35 kDa ist vermutlich einzelnen Nukleotiden zuzuordnen, die nach der Reinigung in der Probe enthalten blieben. Die Messungen fanden mithilfe einer Superdex 200-Säule in 50 mM Hepes pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol statt.

Oligomerisierungszustand der 7SK getroffen werden. Aufgrund der Bindungsflächen für Hexim1, Larp7 und P-TEFb wird jedoch davon ausgegangen, dass die 7SK snRNA monomer ist (siehe Abbildung 30B).

Als nächstes wurde die Interaktion von Larp7 mit der 7SK näher untersucht. Dr. Friederike Itzen beschrieb in ihrer Dissertation, dass sich bei der Komplexbildung von Larp7 und 7SK in elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstests zusätzlich unspezifische Aggregate bilden (Vollmuth, 2010). Diese Aggregatbildung konnte durch Zugabe von Heparin verhindert werden. Die Komplexbildung wurde in der vorliegenden Arbeit durch analytische Gelfiltrationsexperimente näher untersucht (siehe Abbildung 32). Auch hier konnte gezeigt werden, dass sich bei der Komplexbildung von Larp7 und 7SK zusätzlich Aggregate bildeten, deren Molekulargewichte eine Bandbreite von ~400-700 kDa aufwiesen und die teilweise im Ausschlussvolumen eluierten. Bei Zugabe von 10 mg/mL Heparin konnte diese unspezifische Komplexbildung verhindert werden (siehe Abbildung 32B). Heparine sind negativ geladene Polysaccharide, die unspezifisch an positiv geladene Bereiche von Proteinen binden. Somit unterbinden sie die unspezifische, nur auf Ladung beruhende Interaktion von Proteinen mit RNA. Die Ergebnisse von Dr. Itzen konnten somit auch mithilfe der Größenausschlusschromatographie bestätigt werden. Weitere Analysen der Larp7/7SK-Interaktion wurden daher in Gegenwart von Heparin durchgeführt.

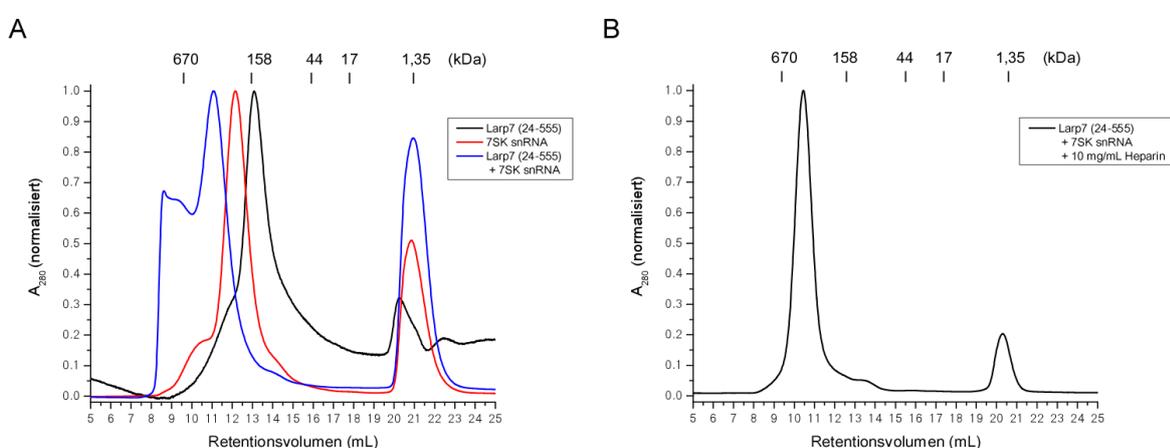


Abbildung 32: Komplexbildung von Larp7 (24-555) und 7SK snRNA. (A) Bei der Komplexbildung von Larp7 und 7SK ergaben sich zusätzliche unspezifische Aggregate (blau). (B) Die Zugabe von 10 mg/mL Heparin ermöglichte die spezifische Komplexbildung. Die Messungen fanden unter Benutzung einer Superdex 200-Säule in 50 mM Hepes pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol statt. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm beobachtet.

Um die Dissoziationskonstante der Larp7-7SK Bindung zu ermitteln, wurde die Komplexbildung mittels isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Dazu wurden zu 10 μ M 7SK snRNA in der Zelle in Injektionsschritten von jeweils 2 μ L 100 μ M Larp7 titriert (siehe Abbildung 33). Es konnte eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich ($K_d = 172$ nM) für die Larp7-7SK-Bindung ermittelt werden. Beide Komponenten

liegen in dem Komplex in einem Verhältnis von 1:1 vor. Die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Es kann beobachtet werden, dass die Amplituden der Wärmetönungsintegrale sehr viel höher sind als bei einer gewöhnlichen ITC-Messung mit zwei Proteinen. Ein Vergleich mit Werten aus der Literatur ergab allerdings, dass diese Werte typisch für Protein-RNA Interaktionen sind (Feig, 2007). Dieser Effekt wird durch die hohen $T\Delta S$ - und ΔH -Werte unterstrichen, welche einerseits zeigen, dass die Reaktion stark exotherm ist und andererseits mit einem Verlust an Entropie verbunden ist. Bei der Bindung von Larp7 an 7SK finden vermutlich weitreichende Konformationsänderungen sowohl der RNA als auch des Proteins statt. Weiterhin ist zu bemerken, dass, obwohl Larp7 mindestens drei RNA-Bindungsmotive besitzt, die Integrationskurve mit einem Ein-Schritt Bindungsmodell angepasst werden konnte.

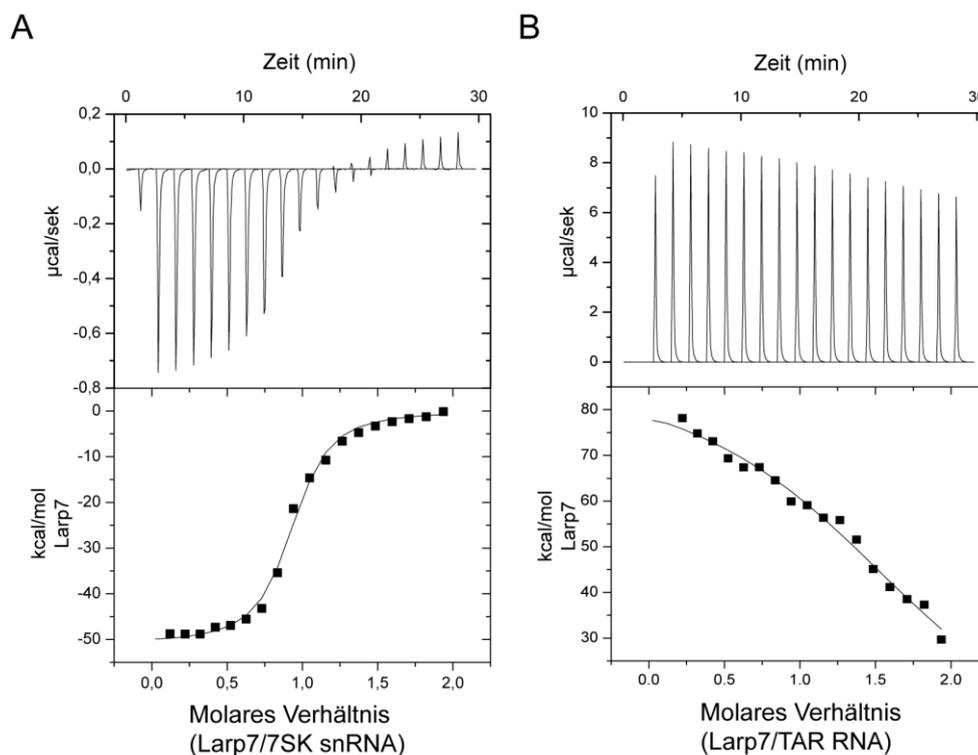


Abbildung 33: ITC-Messungen von Larp7 und 7SK snRNA bzw. EIAV TAR. (A) Die ITC-Titration von 100 µM Larp7 (24-555) zu 10 µM 7SK zeigt deutliche Ausschläge der Wärmetönung, die in die Sättigung übergehen. Die Affinität zwischen beiden Bindungspartnern ist sehr hoch mit einem K_d von 172 nM. (B) Die ITC-Titration von 250 µM Larp7 (24-555) in 25 µM TAR RNA zeigt auch deutlich Ausschläge, allerdings konnte keine vollständige Bindungskurve aufgenommen werden. Der Konzentrationsbereich wurde hier nicht optimal gewählt. Es konnte ein K_d von ~3,4 µM bestimmt werden. Von den gemessenen Signalen wurden Signale der Kontrollmessungen (Puffer zu RNA bzw. Larp7 zu Puffer) subtrahiert.

Tabelle 2: Parameter aus ITC-Messungen von Larp7 mit 7SK snRNA und unspezifischer RNA (TAR).

	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	K_d (μM)	n (molares Verhältnis)
Larp7/7SK	$-50,87 \pm 0,78$	$-41,72$	$-9,15$	$0,17 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,01$
Larp7/TAR	$162,20 \pm 7,32$	$169,56$	$-7,36$	$3,36 \pm 0,69$	$0,54 \pm 0,01$

Da Larp7 auch unspezifisch RNA bindet, wurden zusätzliche ITC-Experimente mit Larp7 und einem EIAV-TAR-ähnlichen RNA-Konstrukt (42 nt), welches kein natürlicher Bindungspartner von Larp7 ist, als Kontrolle durchgeführt. Auch hier konnte Bindung beobachtet werden, allerdings war die Affinität wesentlich schwächer als zum natürlichen Bindungspartner 7SK. Hierbei handelt es sich vermutlich um unspezifische RNA-Protein-Interaktionen. Aufgrund der unvollständigen Bindungskurve sind die ermittelten Werte mit Vorsicht zu betrachten. Der K_d -Wert dieser Bindung lag bei $\sim 3,4 \mu M$. Damit ist die Bindung etwa 20-fach schwächer als bei der spezifischen Larp7-7SK-Interaktion. Die Daten weisen weiterhin darauf hin, dass die Reaktion in diesem Fall endotherm ist und mit einer Zunahme an Entropie verbunden ist. Eine ausführliche Betrachtung der Daten ist in Abschnitt 4.2 zu finden.

Die hohe Affinität von Larp7 zu 7SK passt zu der Annahme, dass Larp7 ein wichtiger stabilisierender Faktor für die RNA ist. Wie in Abschnitt 1.4.3 beschrieben, führt die Depletion von Larp7 auch zur Depletion von 7SK snRNA, was vermuten lässt, dass die 7SK in der Zelle fast ausschließlich in Larp7-gebundener Form vorliegt. Die 7SK wird durch Assoziation mit Larp7 vor Degradation durch Nukleasen geschützt. Da Larp7 durch seine positiv geladenen Bereiche auch unspezifisch an RNA bindet, muss die Affinität zu dem natürlichen Bindungspartner ausreichend hoch sein. Zudem wurde ein Mechanismus der Verdrängung von La durch Larp7 vorgeschlagen (siehe Abschnitt 1.4.3), welches nur bei einer starken Interaktion von Larp7 mit 7SK möglich erscheint.

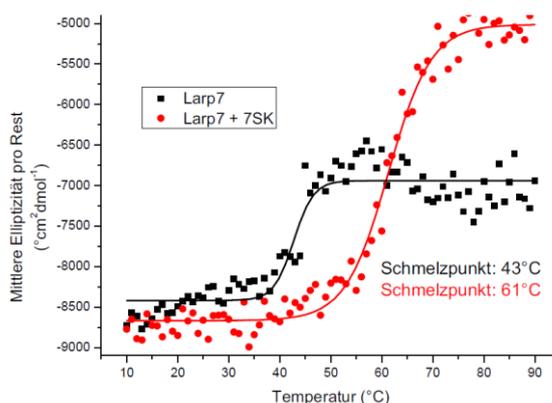


Abbildung 34: Thermale Denaturierungskurven von Larp7 in An- oder Abwesenheit von 7SK snRNA. Es wurde die mittlere Elliptizität pro Rest bei 222 nm über einen Temperaturbereich von 10-90°C beobachtet.

Um das Ausmaß der Stabilisierung abzuschätzen, wurden thermale Denaturierungskurven von Larp7 mit und ohne 7SK snRNA aufgenommen (siehe Abbildung 34). Dabei wurde die mittlere Elliptizität pro Rest bei 222 nm über einen Temperaturbereich von 10-90°C in Schritten von 2K/min beobachtet. Die Schmelztemperatur von Larp7 konnte in Anwesenheit der RNA von 43°C auf 61°C verschoben werden. Larp7 scheint also nicht nur 7SK zu stabilisieren, sondern die RNA scheint auch deutlich zur Stabilisierung des Proteins beizutragen.

3.3.1 Strukturelle Untersuchungen zu Larp7

Es wurden Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente (SAXS) durchgeführt, um strukturelle Informationen von Larp7 zu erhalten (Prof. Dr. Dmitri Svergun, Dr. Weifeng Shang, EMBL Hamburg). Die berechnete *ab initio* Struktur ist in Abbildung 35C zu sehen. Die experimentelle Streukurve wird in Abbildung 35B mit der berechneten Streukurve des *ab initio* Modells verglichen. Die Kurven stimmen überein, wodurch das Modell validiert werden konnte. Ein Vergleich des Modells mit einer Strukturvorhersage durch das Programm I-TASSER (Roy et al., 2010) ließen dabei deutliche Ähnlichkeiten erkennen (siehe Abbildung 35A). Larp7 geht eine elongierte Form ein und kann in fünf Abschnitte unterteilt werden (blau, hellblau, grün, gelb, orange). Die fünf einzelnen globulären Domänen sind durch flexible Linkerregionen miteinander verbunden. Die elongierte Struktur von Larp7 passt zu den unter 3.3 beschriebenen DLS-Messungen und würde eine Erklärung für das hohe Molekulargewicht bieten, welches über den hydrodynamischen Radius ermittelt wurde.

Basierend auf diesen strukturellen Daten wurde vermutet, dass sich nicht wie zuvor angenommen, nur drei RNA-bindende Domänen in Larp7 befinden, sondern sich fünf dieser LAMs bzw. RRM in dem nativen Protein anordnen. Diese neue Domänenanordnung würde auch eine Erklärung für die hochaffine Bindung an 7SK bieten. Die Analyse führte zum Design neuer Larp7-Konstrukte (siehe Abbildung 36). Zunächst wurden ein N- und ein C-terminales Konstrukt entworfen, die jeweils 3 bzw. 2 der RNA-bindenden Domänen enthielten (24-328 und 339-555). Aufgrund der unklar definierten Grenzen der Domänenabschnitte aus dem Programm I-TASSER wurde ein zusätzliches C-terminales Konstrukt mit den Resten 346-555 erstellt. Zudem wurde die Larp7-Sequenz mit der Sequenz eines kristallisierten La-Konstruktes verglichen (Teplova et al., 2006) und führte damit zu dem Entwurf von zwei weiteren, für Kristallisationsexperimente geeigneten Larp7-Konstrukten (24-248 und 24-288).

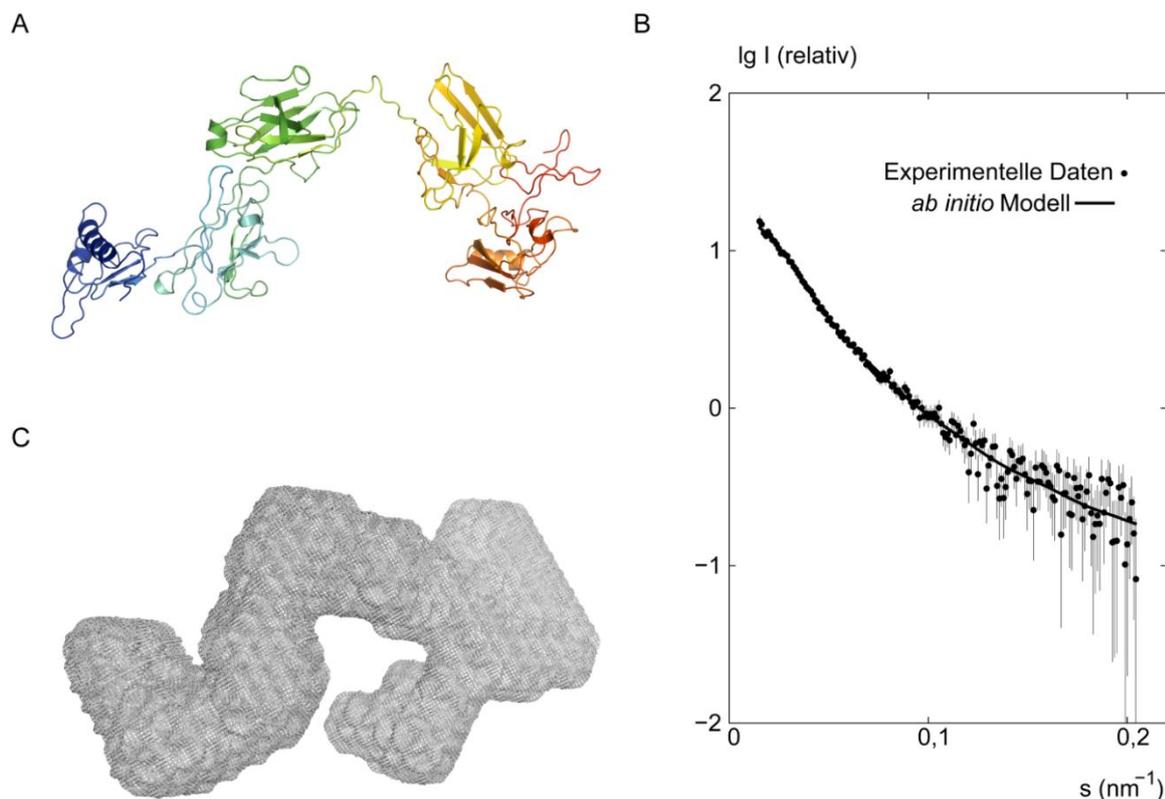


Abbildung 35: Vorhergesagte und *ab initio* berechnete Larp7-Struktur. (A) Strukturvorhersage mit I-TASSER (Roy et al., 2010). Hier sind deutlich fünf unterschiedliche Bereiche zu erkennen. Einerseits wurden die bekannten RNA-bindenden Domänen erkannt (LAM: blau, RRM1: hellblau, RRM2: rot), andererseits wurden zusätzlich zwei weiteren Bereichen eine RRM-ähnliche Domänenfaltung zugewiesen (grün und gelb). (B) Vergleich der Streukurve von Larp7 mit der berechneten Streukurve des *ab initio* Modells. Beide Kurven stimmen miteinander überein. (C) Volumenkarte von Larp7 basierend auf SAXS-Messungen. Zwischen dem *ab initio* Modell und dem I-TASSER-Modell bestehen große Ähnlichkeiten. Das *ab initio* Modell wurde mit dem Programm DAMMIF erstellt (Franke and Svergun, 2009). Die Datenprozessierung erfolgte durch Dr. Weifeng Shang, EMBL Hamburg. Die Volumenkarte ist bei $\sigma = 1,0$ dargestellt.

Sämtliche Larp7-Konstrukte konnten als GST-Fusionsproteine exprimiert und über GSH-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Ein zusätzlicher Reinigungsschritt mithilfe von Heparinmatrix ermöglichte die Abtrennung unspezifisch gebundener RNA. Einige der Proteine wurden weiterhin per Größenausschlusschromatographie prozessiert. Abbildung 37 zeigt die reinen Larp7-Konstrukte in der SDS-PAGE Analyse. Die ersten drei Konstrukte (24-248, 24-288 und 24-328) wiesen geringe Verunreinigungen auf, während die beiden C-terminalen Konstrukte (339-555 und 346-555) sehr sauber waren. Die Reinheit der Proben konnte hier auf >95% bestimmt werden. Eine Verunreinigung durch unspezifisch gebundene RNA konnte bei allen Proteinen durch Ermittlung des A_{260}/A_{280} -Verhältnisses ausgeschlossen werden.

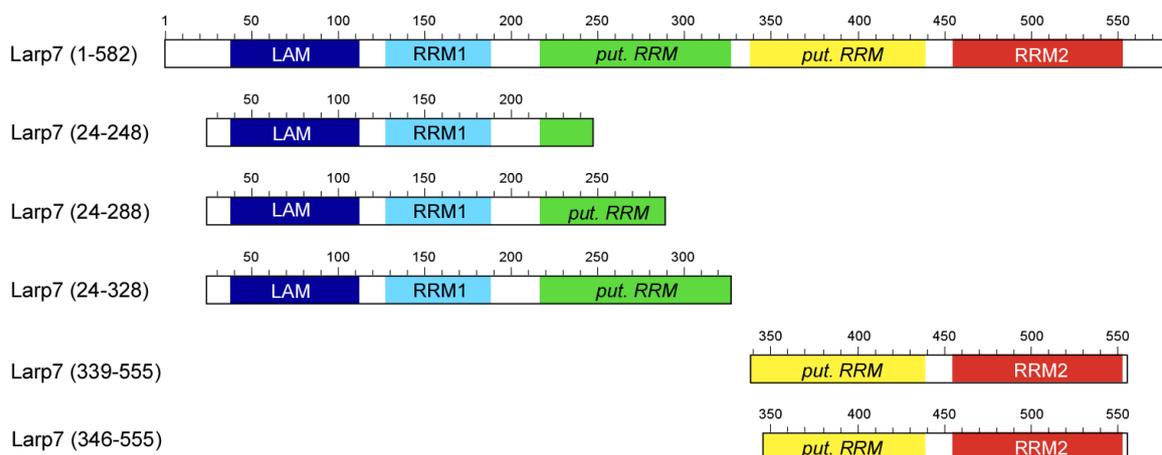


Abbildung 36: Larp7-Konstrukte. Nach Analyse durch SAXS-Messungen und Strukturvorhersage durch I-TASSER konnten neue, putative RNA-Bindungsdomänen im Zentrum von Larp7 identifiziert werden. Aufgrund der neuen Informationen wurden 5 Konstrukte generiert und die Proteine produziert.

Zur Überprüfung der 7SK-Bindung wurden elektrophoretische Mobilitätsverschiebungstests durchgeführt (siehe Abbildung 38). Die auftretende Verschiebung ist verhältnismäßig gering, jedoch ist sie bei allen Konstrukten deutlich erkennbar. Die Masse der Proteine entspricht nur etwa 1/5 der Masse der RNA, wodurch die geringe Verschiebung erklärt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Larp7-Konstrukte eine vollständige Verschiebung der RNA bei einem Verhältnis von 1:1 erreichten. Larp7 (24-288) wies erst bei einem 3-fachen Überschuss eine komplette Komplexbildung auf. Die C-terminalen Konstrukte hingegen zeigten eine sehr gute Bindung an die RNA und konnten schon bei einem 1:1 Verhältnis eine vollständige Verschiebung erreichen.

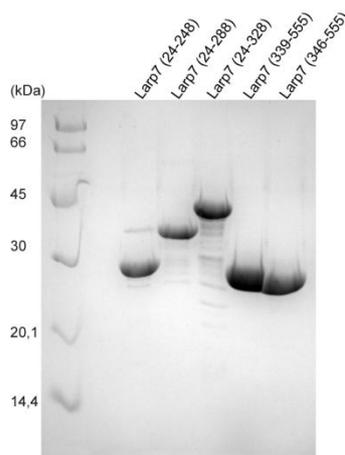


Abbildung 37: SDS-PAGE Analyse der Larp7-Konstrukte. Es wurden jeweils 5 µg Protein aufgetragen. Die N-terminalen Konstrukte (24-248, 24-288 und 24-328) wiesen geringe Verunreinigungen auf. Die Reinheit der Proben betrug >90%. Die Reinheit der C-terminalen Larp7-Konstrukte (339-555 und 346-555) konnten auf >95% bestimmt werden. Es ist eine 18% SDS-PAGE Analyse dargestellt, die mit Coomassie angefärbt wurde.

Ergebnisse

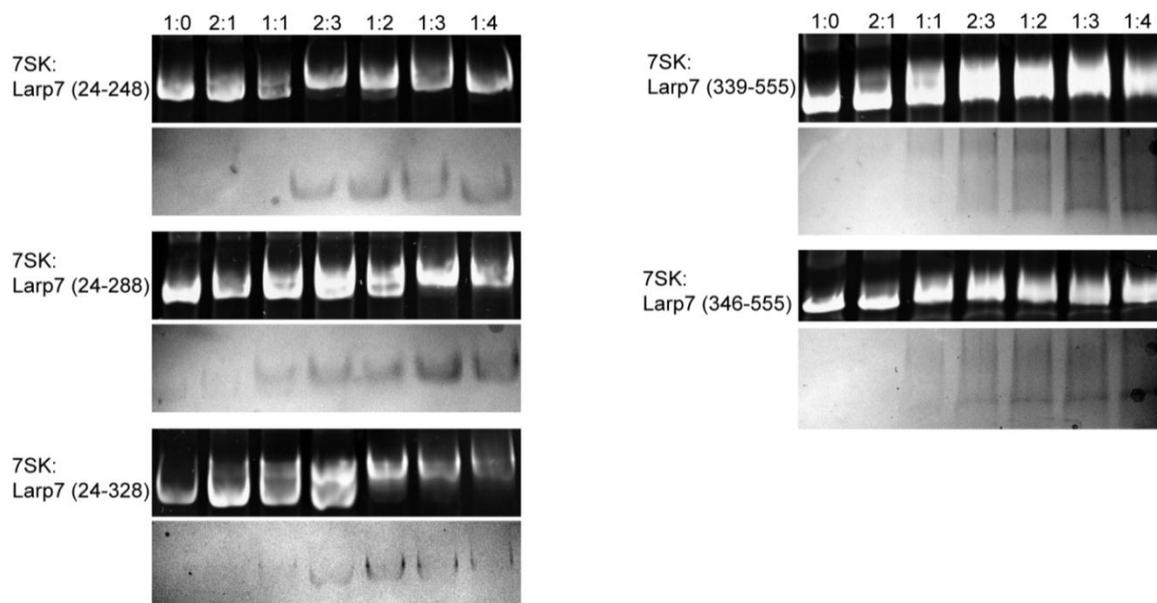


Abbildung 38: Elektrophoretische Mobilitätsverschiebungstests der Larp-Konstrukte mit 7SK snRNA. Es werden jeweils die Ethidiumbromid- und Coomassie-gefärbten Gele gezeigt. Bei allen Larp7-Konstrukten konnte eine Verschiebung der 7SK RNA-Bande beobachtet werden. Das Migrationsverhalten der RNA verlangsamte sich allerdings nur geringfügig, da die Proteinkonstrukte im Verhältnis zur 7SK eher klein waren. Es konnte gezeigt werden, dass Larp7 (24-248) bei einem 1,5-fachen Überschuss die RNA komplett gebunden hatte, Larp7 (24-288) bei einem 3-fachen Überschuss und Larp7 (24-328) bei einem 2-fachen Überschuss. Gründe hierfür könnten in der Reinheit und korrekten Faltung der Proteine liegen. Die C-terminalen Konstrukte zeigten hingegen schon bei einem 1:1 Verhältnis eine vollständige Verschiebung der 7SK.

Wie in Abschnitt 1.4.3 erwähnt sind die LAM- und die RRM1-Domäne starken Umstrukturierungen in Anwesenheit von RNA ausgesetzt und falten sich zu einem stabilen Komplex. Um die Faltung der N-terminalen Larp7-Konstrukte zu gewährleisten, wurde synthetische RNA nach dem Vorbild des 3'-Endes der 7SK snRNA erworben, die mit den Proteinen komplexieren sollte (siehe Abbildung 30B, blauer Abschnitt). Die Sequenzen der RNA-Oligomere sind im Folgenden aufgeführt:

Original 3'-Ende: 5'-CCUUUCUUUU-3'

Union1: 5'-CCGGUCUUUU-3'

Union2: 5'-UGGUCUUUU-3'

Die Sequenzen wurden so gewählt, dass sich nach dem Vorbild der RNA in der La-Kristallstruktur (Teplova et al., 2006) komplementäre Basen gezielt aneinanderlagern und so eine Plattform mit zwei Protein-Bindungsstellen bilden:



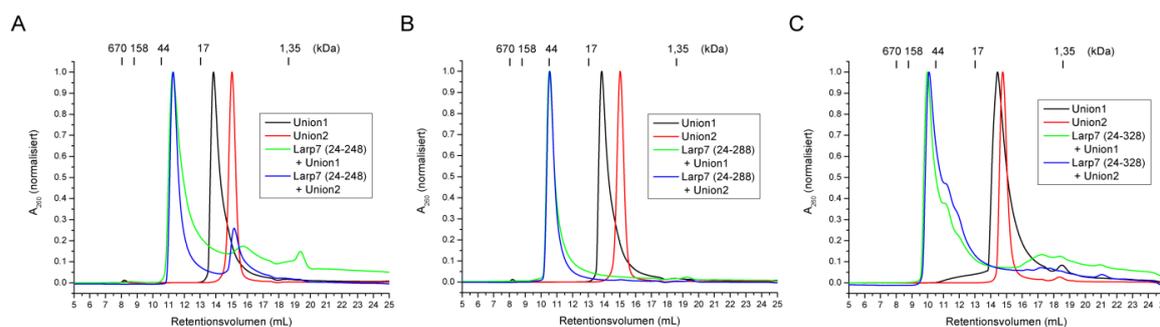


Abbildung 39: Analytische Gelfiltration mit drei Larp7-Konstrukten und den synthetischen RNA-Oligomeren Union1 und Union2. Die Messungen wurden mit einer Superdex 75-Säule in 50 mM Hepes pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM DTE, 1 mM MgCl₂ durchgeführt.

Die Bindung an Larp7 (24-248, 24-288, 24-328) wurde durch analytische Gelfiltrationsexperimente analysiert (siehe Abbildung 39). Man kann deutlich erkennen, dass alle drei Proteine an beide RNA-Oligomere binden. Basierend auf den Ergebnissen der Mobilitätsverschiebungstests wurden die einzelnen Larp-Konstrukte in einem bestimmten Verhältnis zur RNA eingesetzt: Larp7 (24-248) wurde 2:3 (RNA:Protein) eingesetzt, Larp7 (24-288) 1:3 und Larp7 (24-328) 1:2. Für letztere Proteine schien dies das optimale Verhältnis für die Komplexbildung zu sein, neben den Peaks bei ~44 kDa bzw. ~55 kDa waren keine weiteren Peaks für überschüssige RNA oder Protein zu sehen (siehe Abbildung 39B-C). Bei der Komplexbildung mit dem kürzesten Konstrukt Larp7 (24-248) und Union2 war hingegen ein zusätzlicher Peak für die reine RNA zu beobachten (~10 kDa; siehe Abbildung 39A). Demzufolge scheint die Bindung von Larp7 (24-248) an Union2 schlechter zu sein als nach den Mobilitätsverschiebungstests mit 7SK vermutet (siehe Abbildung 38). Zudem konnte bei allen Messungen keine Dimerisierung des Protein-RNA-Komplexes festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein 1:1-Komplex gebildet wurde.

Kristallisationsansätze mit Larp7 (24-248, 24-288, 24-328) und den verschiedenen RNAs Union1 und Union2 und auch den C-terminalen Larp7-Konstrukten (339-555, 346-555) wurden bei jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 15 mg/mL) und zwei verschiedenen Temperaturen (4, 20°C) präpariert. Keiner der Ansätze lieferte bisher für die Datensammlung bzw. Strukturanalyse brauchbare Kristalle.

3.3.2 Analyse der Interaktion von Larp7, 7SK snRNA und Hexim1

Um den Aufbau des 7SK snRNP näher zu untersuchen, wurde die Interaktion von Hexim1 mit Larp7 und 7SK analysiert. Dazu wurden analytische Gelfiltrationsexperimente mit allen drei Bestandteilen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass, wie erwartet, Hexim1 mit 7SK einen stabilen Komplex bildet (siehe Abbildung 40A; besprochen in Diribarne and Bensaude, 2009). Eine Interaktion zwischen Hexim1 und Larp7 konnte hingegen nicht beobachtet werden (siehe Abbildung

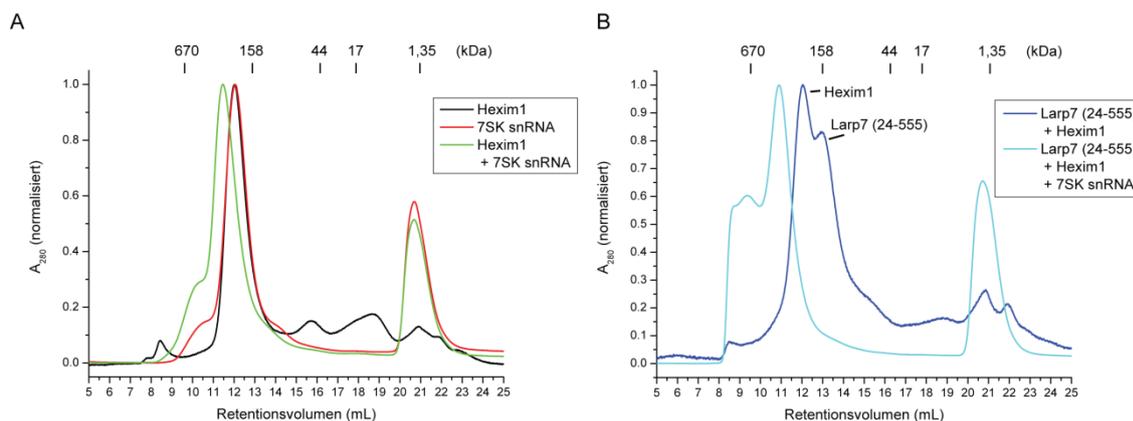


Abbildung 40: Bildung des snRNP Komplexes aus Hexim1, 7SK snRNA und Larp7. Analytische Gelfiltration unter Benutzung einer Superdex 200-Säule in 50 mM Hepes pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol. Larp7 und Hexim1 bilden in Abwesenheit von 7SK snRNA keinen Komplex. 7SK ist das zentrale Element der 7SK snRNP-Komplexformierung.

40B). Es ist deutlich zu sehen, dass sich nur in Anwesenheit von 7SK ein Komplex bildete, der beide Proteine enthielt (siehe Abbildung 40B, hellblaue Kurve). Der Elutionspeak dieses Komplexes entsprach einem Molekulargewicht von ~400 kDa. Dies würde dafür sprechen, dass in diesem Fall alle Untereinheiten als Dimer vorliegen. Zusätzlich konnte eine Aggregatbildung beobachtet werden, die auch durch Zugabe von Heparin nicht verhindert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Messungen unterstreichen, dass die 7SK snRNA das zentrale Element des 7SK snRNPs ist und vermutlich als Gerüst für die Assemblierung der Untereinheiten Larp7, Hexim1, Cyclin T1 und Cdk9 dient.

3.3.3 Analyse der Interaktion von Larp7, 7SK snRNA und BCDIN3

In der Literatur wurde eine Interaktion von der Methyltransferase BCDIN3 mit Larp7 beschrieben (Xue et al., 2010). Zudem wurde postuliert, dass BCDIN3 eine stabile

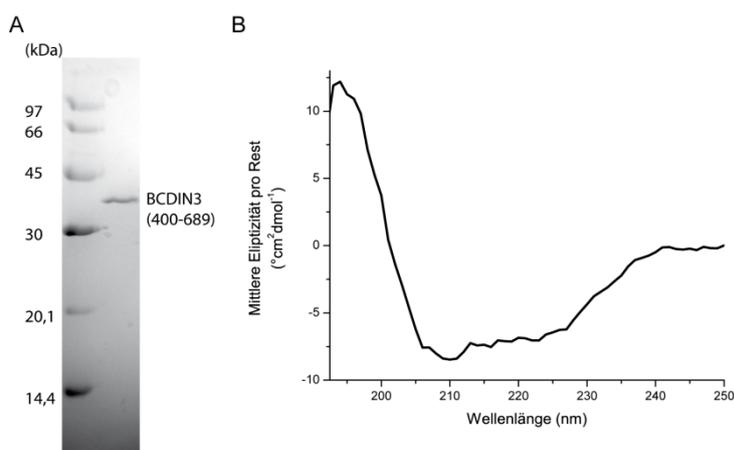


Abbildung 41: Darstellung von BCDIN3. (A) 18% SDS-PAGE des gereinigten BCDIN3 (400-689). Die Reinheit des Proteins betrug >95%. (B) CD-Spektrum von BCDIN3 (400-689).

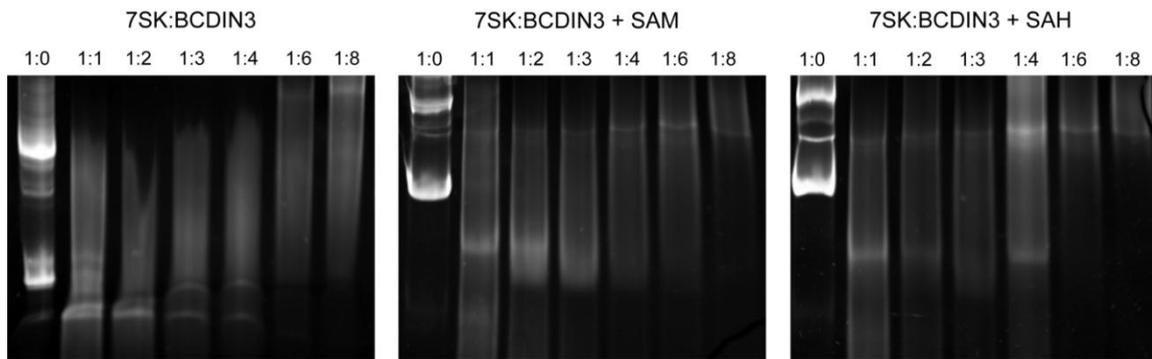


Abbildung 42: Mobilitätsverschiebungstest mit BCDIN3 (400-689) und 7SK snRNA. In allen drei Fällen kann eine Verschiebung der RNA beobachtet werden, allerdings bilden sich erst bei einem hohen Überschuss an BCDIN3 (6-fach) Komplexe mit der 7SK. Ein Unterschied der Verschiebung in An- oder Abwesenheit des Kosubstrats SAM oder des Inhibitors SAH war nicht festzustellen. Es konnte in keinem der drei Fälle ein stabiler, stöchiometrischer Komplex gebildet werden.

Untereinheit des 7SK snRNPs darstellt (Krueger et al., 2008). Um diese Interaktionen näher zu untersuchen, wurde zunächst die Methyltransferasedomäne von BCDIN3 (400-689) als GST-Fusionsprotein exprimiert und über Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt (siehe Abbildung 41). Die Faltung des Proteins wurde durch CD-Messungen überprüft. Eine Analyse mit dem Programm Dichroweb (Whitmore and Wallace, 2004) ergab, dass das Protein zu über 40% helikal gefaltet ist, 30% von Faltblättern eingenommen werden und sich die Reste der übrigen 30% in Schleifen befinden oder ungeordnet sind.

Mobilitätsverschiebungstests mit 7SK in An- oder Abwesenheit des Kosubstrats SAM oder des Inhibitors der Methylierung SAH (S-Adenosylhomocystein) sollten Aufschlüsse über die Komplexbildung zwischen 7SK snRNA und BCDIN3 geben. Abbildung 42 zeigt, dass in keinem Fall ein stabiler, stöchiometrischer Komplex mit 7SK gebildet werden konnte. Erst bei hohem Überschuss an BCDIN3 (6- bis 8-fach) konnte eine

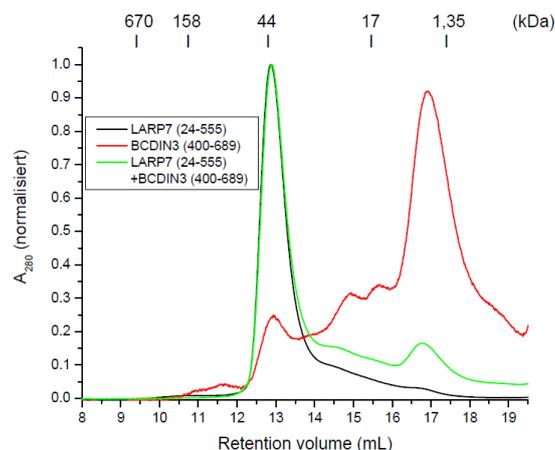


Abbildung 43: Untersuchung der Interaktion von BCDIN3 mit Larp7. Analytische Gelfiltration unter Benutzung einer Superdex 75-Säule in 50 mM Hepes pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol. Larp7 und BCDIN3 (400-689) bilden keinen Komplex.

Verschiebung beobachtet werden. Zudem sind die Banden sehr verschmiert, was auf unspezifische Aggregatbildung schließen lässt.

Die Bindung von BCDIN3 an Larp7 wurde mithilfe analytischer Gelfiltration untersucht (siehe Abbildung 43). Die Analyse zeigte, dass kein direkter Komplex zwischen der Methyltransferasedomäne von BCDIN3 und Larp7 generiert werden konnte. Beide Proteine eluierten unabhängig voneinander. Auch bei MBP-Immobilisationsexperimenten konnte keine Bindung zwischen den Proteinen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen von Xue et al., die eine eindeutige Interaktion der beiden Proteine beobachten konnten. Die Daten werden in Abschnitt 4.2.1 ausführlich diskutiert.

3.4 Darstellung des vollständigen 7SK snRNP und primäre strukturelle Charakterisierung

Etwa 50% von P-TEFb liegt in der Zelle als Teil des großen inaktiven 7SK snRNP Komplexes mit den zusätzlichen Untereinheiten Hexim1, 7SK und Larp7 vor (Chen et al., 2004; Michels et al., 2003; Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001; Yik et al., 2003). Um einen Einblick in die strukturelle Anordnung dieses Komplexes zu gewinnen, wurde dieser rekombinant rekonstituiert. Dazu wurde zunächst die Untereinheit Cdk9 (1-372) in Insektenzellen und die Untereinheiten Cyclin T1 (1-272), Hexim1 (1-359) und Larp7 (24-555) in *E. coli*-Zellen exprimiert. Die Vollängen 7SK snRNA (332 nt) wurde wie zuvor von Frau Karin Vogel-Bachmayr präpariert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der vollständige Komplex besitzt ein Molekulargewicht von ~324 kDa unter der

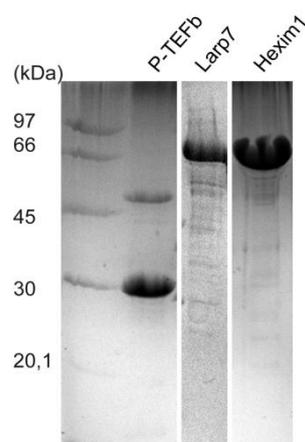


Abbildung 44: 18% SDS-PAGE der Proteinuntereinheiten des 7SK snRNPs. P-TEFb wurde aufgrund von Stabilitätsproblemen von isoliertem Cdk9 kogereinigt. Larp7 und Hexim1 wurden wie beschrieben RNA-frei aus *E. coli* Zellen produziert (siehe Abschnitt 2.3.10).

Annahme, dass nur Hexim1 als Dimer vorliegt. Vorangehende Analysen ergaben, dass Cdk9 allein nicht stabil ist, daher wurde Cdk9 mit Cyclin T1 kogereinigt. Eine SDS-PAGE Analyse der einzelnen gereinigten Proteine ist in Abbildung 44 zu sehen. Die Analyse der Komplexformierung wurde dahingehend erschwert, dass Larp7 und Hexim1 trotz unterschiedlicher Größen im SDS-Gel ein ähnliches Migrationsverhalten aufweisen.

In initialen Versuchen, den Komplex zu rekonstituieren, wurden die Proteinuntereinheiten zusammen mit der 7SK snRNA mittels analytischer Gelfiltration untersucht (siehe Abbildung 45). Dazu wurden sowohl alle Untereinheiten separat (blau,

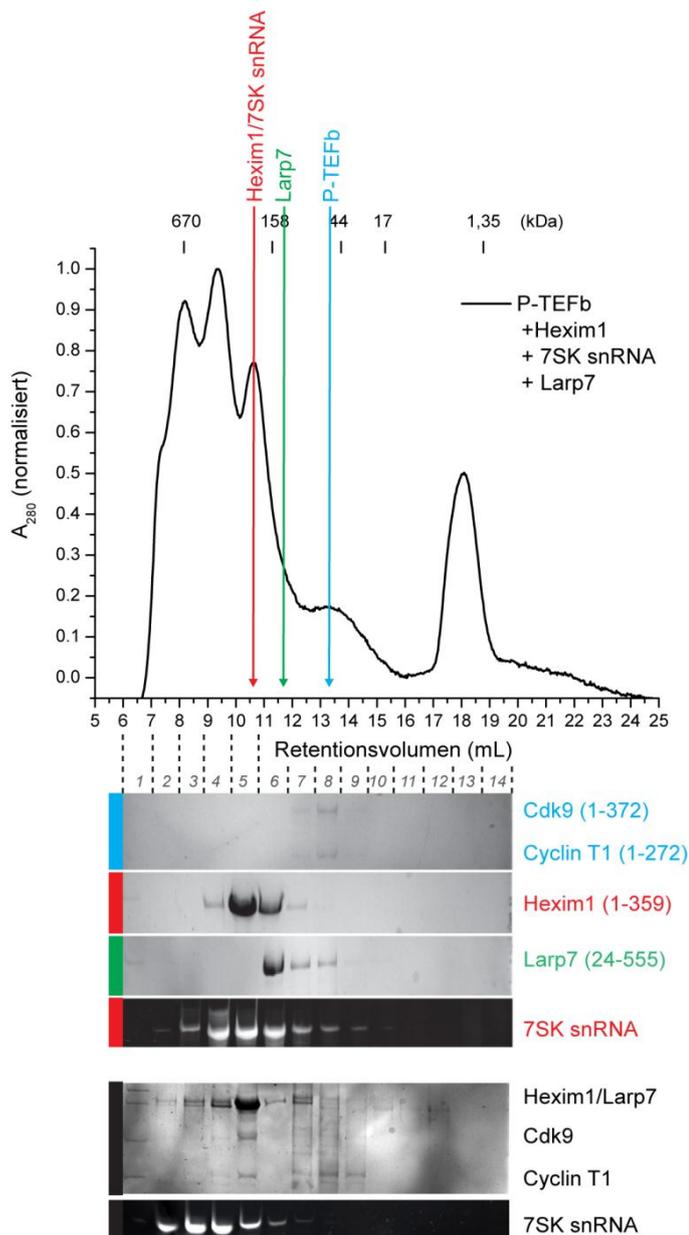


Abbildung 45: Rekonstitution des 7SK snRNPs mittels analytischer Gelfiltration. Für die Untersuchung wurde eine Superdex 200-Säule mit dem Puffer 50 mM HEPES pH 7,5, 350 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 2 mM TCEP, 2 mM MgCl₂ verwendet. Nach Fällung der Protein- und RNA-Fractionen wurden diese per SDS- bzw. Urea-PAGE analysiert. Die Gele wurden mit Coomassie bzw. Ethidiumbromid gefärbt. Die gesammelten und analysierten Fraktionen sind in grau gekennzeichnet und durch gestrichelte Linien voneinander getrennt.

rot, grün) als auch der assemblierte Komplex aufgetragen (schwarz), Fraktionen gesammelt und gefällte Fraktionen je nach Protein- bzw. RNA-Gehalt mittels SDS- bzw. Urea-PAGE analysiert. Die Gele zeigen, dass alle Untereinheiten in dem Komplex enthalten waren (Fraktion 5, schwarz), Larp7 und Hexim1 waren jedoch leicht im Überschuss. Die dickere Bande im SDS-Gel setzt sich zwar aus Larp7 und, aufgrund der Dimerisierung, der zweifachen Menge an Hexim1 zusammen, dennoch sind beide Proteine etwas im Überschuss gegenüber Cdk9 und Cyclin T1. Zusätzlich hatten sich offensichtlich Aggregate gebildet. Eine homogene Zusammensetzung konnte per analytischer Gelfiltration nicht erreicht werden, jedoch zeigen die Ergebnisse, dass der Komplex aus allen Untereinheiten rekonstituiert werden konnte. Eine auf diese Art und Weise assemblierte, initiale Probe wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Holger Stark (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) elektronenmikroskopisch untersucht. Um eine möglichst hohe Homogenität des pentameren Komplexes zu erreichen, wurde die Probe zunächst über die GraFix-Methode sedimentiert (Kastner et al., 2008). Nach Fraktionierung des Glycerolgradienten wurden verschiedene Fraktionen auf ihren Proteingehalt hin im Elektronenmikroskop überprüft. Die negative Anfärbung mit Uranylacetat, einem Material von hoher Elektronendichte, ermöglicht einen hohen Kontrast des Proteinkomplexes relativ zum EM-Gitter und zusätzlich die Konservierung der in der Probe enthaltenen Spezies.

Abbildung 46A zeigt Abbilder der 7SK snRNP-haltigen Fraktion mit negativer Färbung. Der initial rekonstituierte Komplex ist eindeutig erkennbar, allerdings ist die Probe sehr heterogen. Aus diesen Abbildern konnten Klassensummen von Komplexen gleicher Orientierung bestimmt werden (siehe Abbildung 46B). Die untersuchten Partikel befinden sich in vielen verschiedenen Orientierungen auf dem Gitter. Diese Orientierungen müssen unterschieden und einer bestimmten Klassensumme zugeordnet werden. Je mehr Partikel einer Klassensumme zugeordnet werden können, desto genauer kann die Struktur bestimmt werden. Aus den erhaltenen Klassensummen wurde ein vorläufiges 3D-Modell berechnet (siehe Abbildung 47). Aufgrund der Heterogenität der Probe konnte das Modell allerdings bislang nicht verifiziert werden.

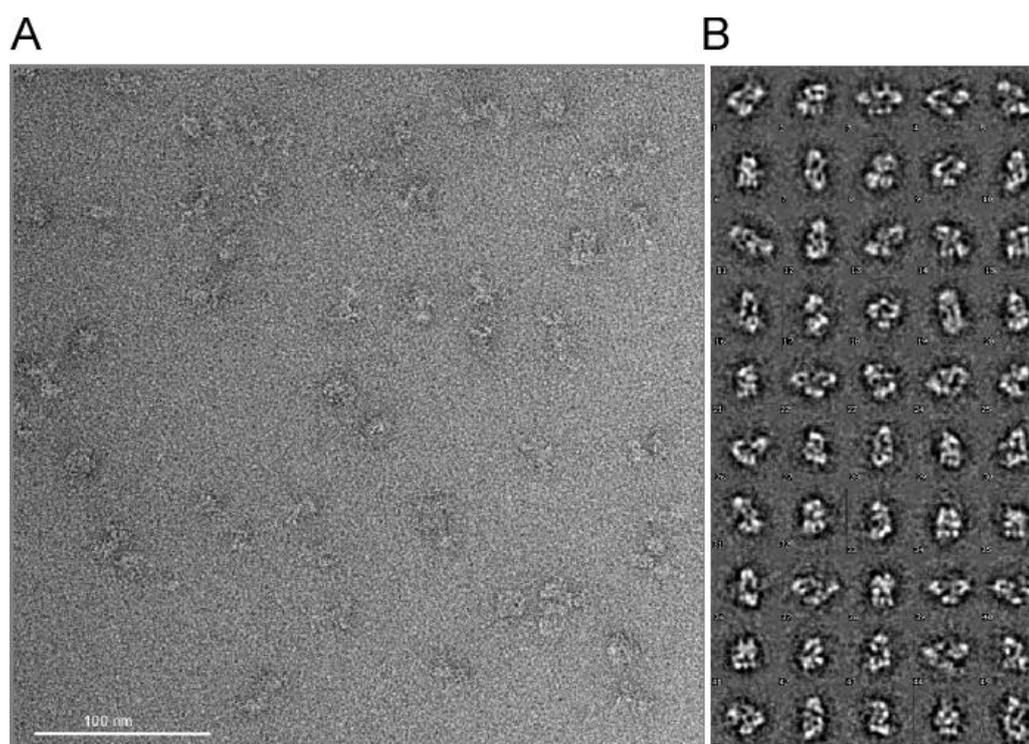


Abbildung 46: Negative Färbung der GraFix-behandelten 7SK snRNPs. (A) EM-Mikrobild des initial rekonstituierten Komplexes. (B) Klassensummen des 7SK snRNPs. Die Klassensummen spiegeln die einzelnen Orientierungen des Komplexes auf dem EM-Gitter wider.

Im Rahmen dieser Arbeit war es bisher nicht möglich in das berechnete Modell eine Untereinheit des 7SK snRNPs zu fitten. Der Größe nach handelt es sich wahrscheinlich um ein Dimer des Komplexes. Diese Überlegung wird durch die apparente 2-fache Symmetrie des Modells unterstützt.

Für eine bessere und genauere Strukturanalyse sollten Cryo-EM Aufnahmen gemacht werden. Bei dieser Methode wird die Probe in vitrifiziertem Wasser der elektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Dadurch minimiert man die Strahlungsschäden und erreicht eine höhere Auflösung. Für diese Methode musste die Rekonstitution des Komplexes optimiert werden, damit eine homogene Probe von höherer Konzentration präpariert werden konnte. Da durch die vorangehenden Analysen validiert wurde, dass die 7SK snRNA das zentrale Element des vollständigen inhibierten P-TEFb-Komplexes ist, sollte die Reihenfolge der Rekonstitution dies berücksichtigen. Zudem war es wichtig, den Komplex frisch zu präparieren, um mögliche Beschädigungen durch Einfrieren zu vermeiden. Dazu wurde zunächst Hexim1 und Cyclin T1 separat über GSH-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Entfernen des GST-Ankers wurde ein Komplex aus beiden Untereinheiten durch Größenausschlusschromatographie gewonnen. Der bestehende Cyclin T1/Hexim1-Komplex wurde zusammen mit 6xHis-Cdk9 über Nickelaffinitätschromatographie isoliert. Derweil wurde MBP-Larp7 mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt und an Dextrin-Matrix immobilisiert. Die Zugabe von 7SK zu immobilisierten Larp7 und anschließende

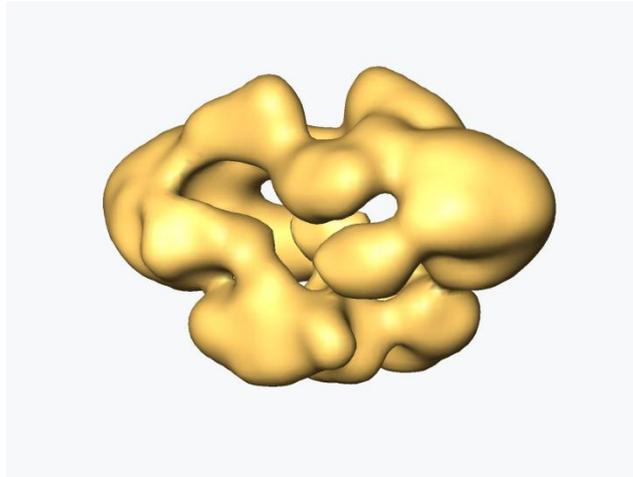


Abbildung 47: Vorläufiges 3D-Modell des 7SKsnRNPs. Die Berechnung erfolgte durch Prof. Dr. Holger Stark, Göttingen.

Waschschritte ermöglichten die Generierung eines homogenen Larp7/7SK-Komplexes. Die Formierung dieses Subkomplexes erschien sinnvoll, da zuvor gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von 7SK zu Larp7 die Stabilität beider Moleküle erhöht (siehe Abschnitt 3.3). Zudem ist bekannt, dass 7SK fast ausschließlich in Verbindung mit Larp7 in der Zelle vorliegt (He et al., 2008). Durch Zugabe von P-TEFb/Hexim1 zu dem präformierten Larp7/7SK-Komplex konnte das vollständige 7SK snRNP rekonstituiert werden. Der MBP-Anker von Larp7 wurde im Anschluss unter Verwendung der PreScission-Protease abgetrennt, so dass sich das 7SK snRNP nach Zentrifugation in der löslichen Fraktion befand. Eine bildliche Darstellung der Reinigungsstrategie ist in Abbildung 48 zu sehen. Die finale Ausbeute aus jeweils 6 L Zellkultur betrug 0,3 mg.

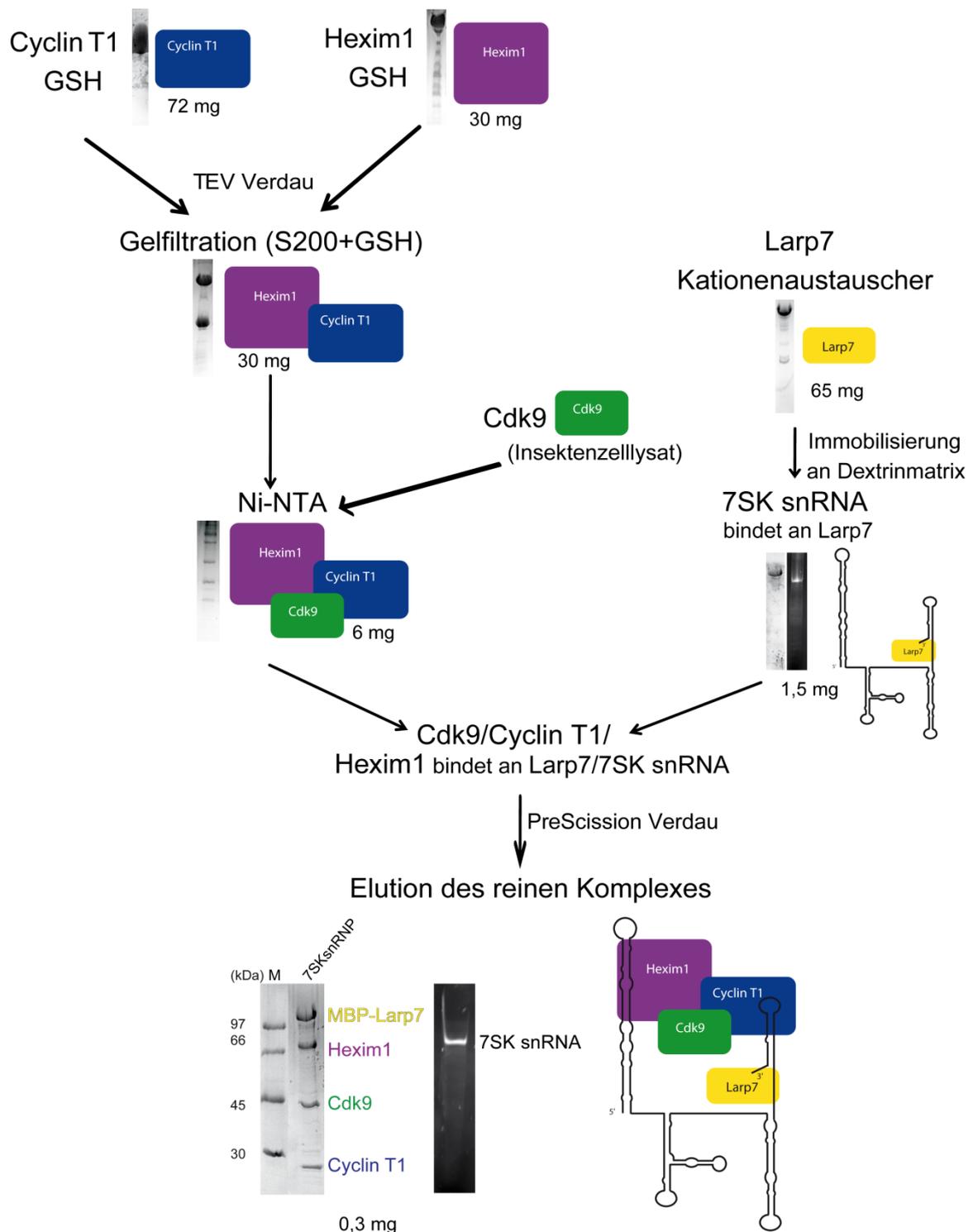


Abbildung 48: Rekonstitution des 7SK snRNPs. Über GSH-Affinitätschromatographie gereinigtes Cyclin T1 und Hexim1 wurde per Gelfiltration komplexiert. Ein ternärer Subkomplex aus Cdk9, Cyclin T1 und Hexim1 wurde durch Ni-Affinitätschromatographie assembliert. Parallel wurde MBP-Larp7 über einen Kationenaustauscher vorgereinigt und an Dextrin-Matrix immobilisiert. Durch Zugabe von 7SK snRNA entstand ein stabiler RNA-Protein Subkomplex. Alle Komponenten wurden nun vereint. Das Schneiden des MBPs von Larp7 ermöglichte die Elution des vollständigen 7SK snRNPs. Die Ausbeute nach jedem Reinigungsschritt ist in mg angegeben.

Ergebnisse

Mit dem so rekonstituierten großen, inhibierten Komplex wurden Thermofluormessungen durchgeführt (David Haselbach, unveröffentlicht). Diese Methode dient dazu, zahlreiche Bedingungen zu testen, die die Stabilität des Komplexes beeinflussen können, um so optimale Puffer- und Salzbedingungen zu identifizieren. Es wurden zum einen verschiedene Pufferbedingungen getestet, zum anderen wurde der Einsatz von Additiven untersucht. Eine vollständige Liste der verwendeten Chemikalien ist in Abschnitt 7.4 zu finden. Abbildung 49A zeigt die Schmelztemperaturen des rekonstituierten Komplexes in Anwesenheit von verschiedenen Puffersubstanzen und variablem pH-Wert. Es konnte gezeigt werden, dass es verschiedene Pufferbedingungen gab bei dem der Komplex stabil war. Darunter waren die Puffersubstanzen Bis Tris, Hepes, MES und Kalium-/Natriumphosphat. Phosphatpuffer ist für elektronenmikroskopische Untersuchungen nicht geeignet, da es den Farbstoff Uranylacetat präzipitiert. Auch Tris-Puffer kann nicht genutzt werden, da die Aminogruppen mit dem Quervernetzer Glutaraldehyd interagieren. Hepes pH 7,5 wurde ursprünglich für die Reinigung des Komplexes verwendet, allerdings zeigten die Thermofluordaten, dass

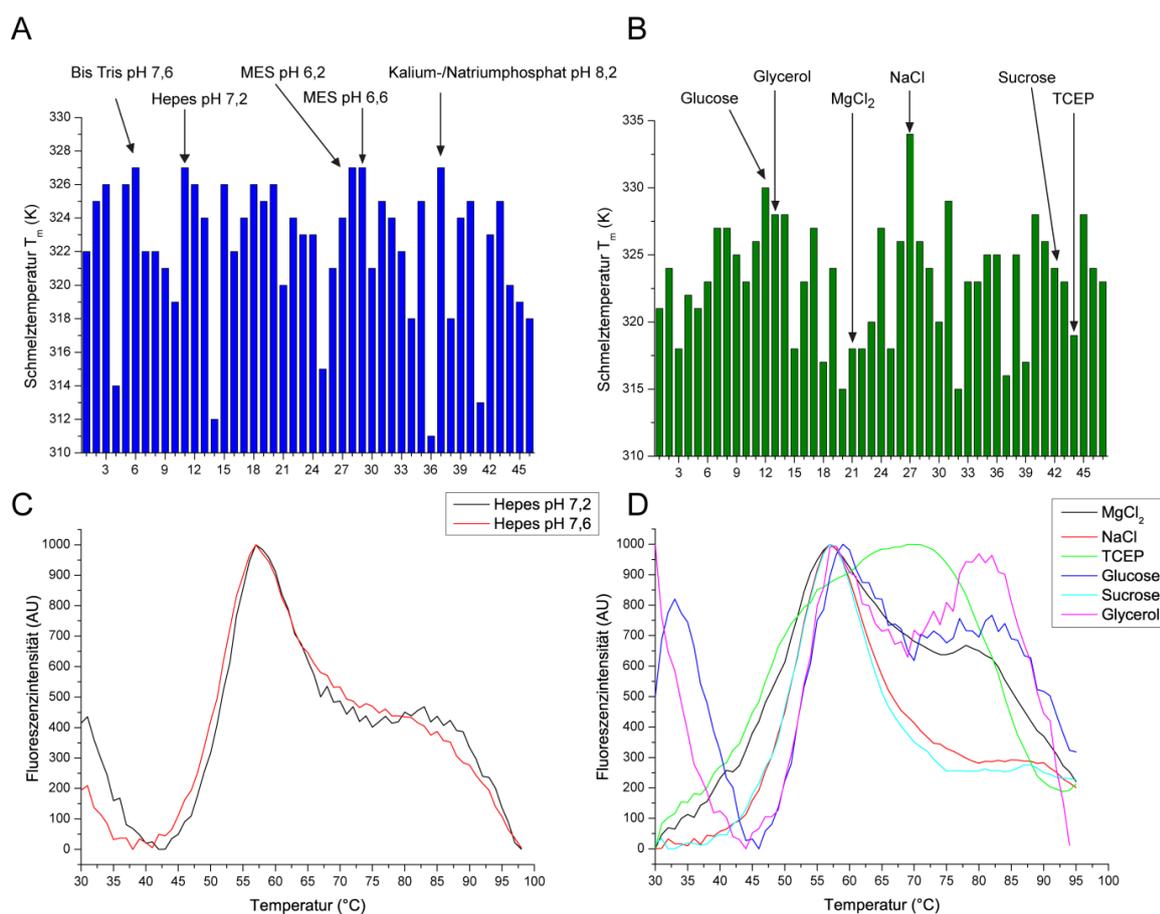


Abbildung 49: Ergebnisse der Thermofluoruntersuchungen des 7SK snRNPs. (A-B) Vergleich der Schmelztemperaturen des 7SK snRNP-Komplexes in Anwesenheit verschiedener Puffersubstanzen und üblichen Zusätzen. (C-D) Vergleich der Schmelzkurven des 7SK snRNPs in Anwesenheit bisher verwendeter Substanzen und stabilisierender Substanzen.

Hepes mit einem pH-Wert nahe der Neutralität besser geeignet war. Daher wurde im Folgenden Hepes pH 7,0 als Standardpuffer für weitere Reinigungen des Komplexes gewählt. Abbildung 49C zeigt den Vergleich der Schmelzkurven des 7SK snRNPs in Anwesenheit von Hepes pH 7,6 und Hepes pH 7,2. Man kann eine deutliche Rechtsverschiebung der Schmelzkurve bei niedrigerem pH-Wert erkennen, was auf eine Stabilisierung des Komplexes schließen lässt. Desweiteren zeigen die Schmelzkurven einen steilen und kontinuierlichen Verlauf. Dies deutet darauf hin, dass die Untereinheiten des Komplexes simultan denaturieren. Die Schultern der Kurven bei höheren Temperaturen spiegeln vermutlich die Entfaltung der RNA wider.

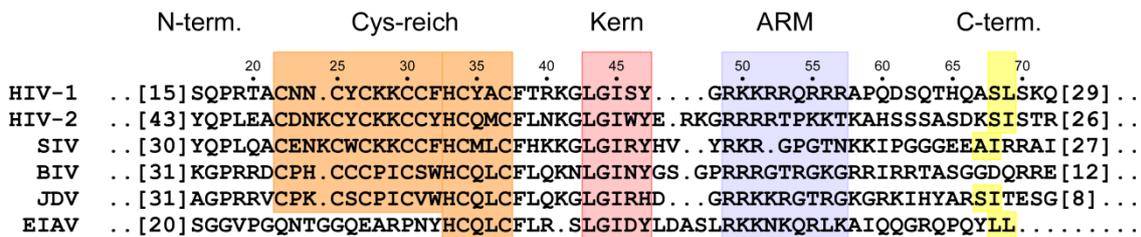
Desweiteren wurden eine Vielzahl an Zusätzen auf ihre stabilisierenden Eigenschaften hin untersucht (siehe Abbildung 49B). Dabei konnte gezeigt werden, dass das bislang verwendete Glycerol keine geeignete Substanz für den GraFix-Gradienten darstellte. Zwar sind die Schmelztemperaturen für Glycerol als auch für Glucose vergleichsweise hoch (328 bzw. 330 K), jedoch ist schon zu Beginn eine hohe Fluoreszenzintensität zu sehen. Dies weist darauf hin, dass bei niedrigen Temperaturen ein Teil des Komplexes ungefaltet vorliegt. Die Schmelzkurve des Komplexes in Anwesenheit von Sucrose zeigt einen kontinuierlichen und steilen Verlauf (siehe Abbildung 49D) und eine Schmelztemperatur von 324 K, daher wurden für die folgenden Gradienten 10-30% (w/v) Sucrose verwendet. Ungewöhnliche Peaks bei höheren Temperaturen, wie beispielsweise in Anwesenheit von Glycerol oder Glucose, sind auf Luftblasen in der Probe zurückzuführen. Weiterhin sind in Abbildung 49D die Schmelzkurven der im Standardpuffer verwendeten Zusätze zu sehen. Natriumchlorid zeigt dabei stabilisierende Eigenschaften, während TCEP und Magnesiumchlorid eher destabilisierend wirken. In dem Assay wurden 10 mM ungepuffertes TCEP eingesetzt, wodurch der pH-Wert in den stark sauren Bereich geändert wird. Daher ist die Auswertung in diesem Fall nicht sinnvoll. Magnesiumchlorid wurde in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Im Folgenden wurde der Puffer 50 mM Hepes pH 7,0, 350 mM Natriumchlorid, 5% Glycerol, 0,5 mM TCEP, 1 mM Magnesiumchlorid für die Komplexreinigung verwendet. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten allerdings noch keine verlässlichen elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Komplexes generiert werden.

3.5 Komplexbildung von Cyclin T1, HIV-1 Tat und TAR

Neben der Assemblierung des 7SK snRNPs bestand ein weiterer Teil dieser Arbeit in der Rekonstitution des viral aktivierten Komplexes aus Cyclin T1, HIV-1 Tat und TAR RNA (Bigalke et al., 2011). Wie in Abschnitt 1.5.1 beschrieben, rekrutieren TAR und Tat durch Interaktion mit Cyclin T1, die Kinase Cdk9 zur RNA-Polymerase II, um die Transkription viraler Gene zu stimulieren (besprochen in Michels and Bensaude, 2008).

Trotz der geringen Proteingröße weist Tat einige funktionelle Regionen auf, die zwischen lentiviralen Spezies hochkonserviert sind (siehe Abbildung 50). An eine variable N-terminale Region von 20-50 Aminosäuren Länge schließt sich eine Cysteinreiche Sequenz an (22-37). Hier befinden sich in einem Abschnitt von 16 Resten 7 Cysteine, die für die Bildung von zwei Zinkfingern verantwortlich sind. Laut der Kristallstruktur des humanen P-TEFb/Tat Komplexes (Tahirov et al., 2010) wird ein

A



B

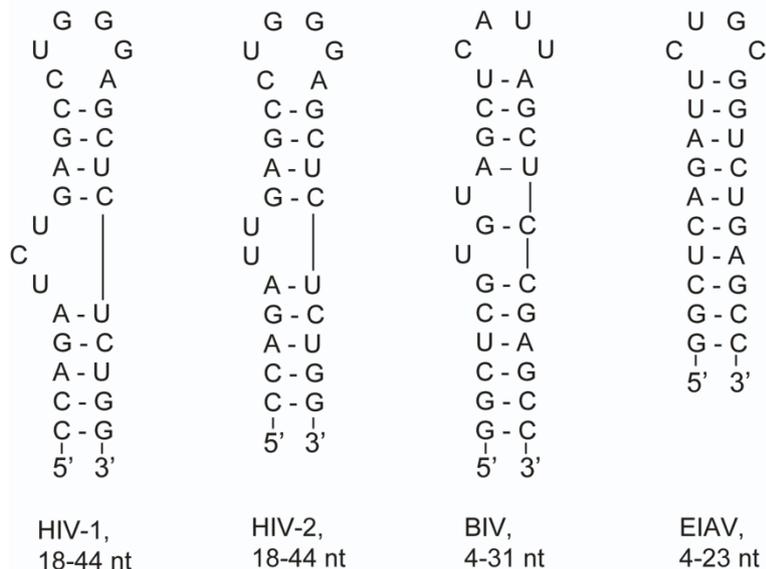


Abbildung 50: Übersicht über Tat und TAR. (A) Sequenz-Alignment lentiviraler Tat-Sequenzen. Die Nummerierung entspricht den Resten in HIV-1 Tat. Konservierte Elemente sind farblich gekennzeichnet. (B) Strukturen der TAR RNA Haarnadelschleife aus HIV-1, HIV-2, BIV und EIAV (Bigalke et al., 2011).

Zinkion durch die Reste Cys22, Cys37, Cys34 und His33 koordiniert, während der zweite, intermolekulare Zinkfinger von den Resten Cys30, Cys27, Cys25 und Cys261 (Cyclin T1) gebildet wird. Es verbleibt jedoch Gegenstand der Forschung, ob es sich bei dieser Anordnung um ein kristallographisches Artefakt handelt. In EIAV Tat wird der Zinkfinger höchstwahrscheinlich aus His39, Cys40, Cys43 und Cys261 (Cyclin T1), aus Mangel an weiteren Cysteinen bzw. Histidinen in dieser Sequenz, gebildet. Aufgrund der Homologie, könnte man von einer ähnlichen Struktur in HIV-1 Tat ausgehen (His33, Cys34, Cys37 und Cys261). Zudem sind die 8 C-terminalen Reste von Cyclin T1 in der von Tahirov et al. bestimmten Struktur nicht aufgelöst. Zwischen Cys261 und Leu252, dem letzten aufgelösten Rest, liegen über 23 Å, während der C-Terminus von Cdk9 eines Symmetrie-verwandten Moleküls nur ~9 Å entfernt ist. Am C-Terminus von dem verwendeten Cdk9 befindet sich ein nicht aufgelöster Histidinaffinitätsanker, der in der Lage wäre den beobachteten Zinkfinger als sog. Artefakt zu bilden.

Weiterhin befindet sich in Tat die sogenannte Kernregion (43-47) mit dem Motiv Lys-Gly-Ile-Xxx-Tyr, das in allen lentiviralen Spezies hochkonserviert ist. Das sich daran anschließende Arginin-reiche Motiv (ARM, 49-57) ist für die TAR-Bindung essentiell. Der C-terminale Bereich ist weniger konserviert und variabel in seiner Länge. In Abwesenheit von Cyclin T1 oder TAR ist Tat sehr flexibel. HIV-1 TAR umfasst eine Länge von 80 nt, wobei der Abschnitt 19-43 notwendig und hinreichend für die Bindung an Tat ist. Diese Sequenz bildet eine Haarnadelschleife mit einer Pyrimidin-reichen Ausbuchtung von 3 Nukleotiden aus (23-25 nt, siehe Abbildung 50B). Im Gegensatz dazu weisen HIV-2 und JDV TAR RNA eine Ausbuchtung von nur 2 Nukleotiden und BIV TAR von zweimal jeweils einem Nukleotid auf. EIAV TAR hingegen besitzt gar keine Ausbuchtung. Alle TAR RNAs scheinen eine stabile doppelsträngige Struktur auszubilden, während die Schleife hoch dynamisch in Abwesenheit eines Liganden ist. Es bleibt zu bemerken, dass die Länge des TAR-bindenden Arginin-reichen Motivs (ARM) reziprok mit der Größe der Ausbuchtung der dazugehörigen TAR RNA übereinstimmt. Dies scheint für die Erkennung und die Spezifität essentiell. Die Analyse der molekularen und strukturellen Grundlagen der Komplexbildung aus den viralen Komponenten Tat und TAR sowie den zellulären Proteinen Cyclin T1 und Cdk9, bilden einen weiteren Schritt zum Verständnis der viralen Transkriptionsaktivierung.

Für die Assemblierung des Komplexes wurden zwei Strategien verfolgt: einerseits wurde das Cyclinbox-umfassende Cyclin T1 (1-272), HIV Tat (1-72) und HIV TAR (19-43) isoliert und verwendet, andererseits wurde ein Fusionskonstrukt aus Cyclin T1 (1-272) und Tat (1-72) produziert. Die beiden Proteine waren über einen kurzen Glycinlinker miteinander verbunden. Die gereinigten Untereinheiten wurden für jeweils eine Stunde bei 4°C miteinander inkubiert und auf eine Superdex 75 Säule aufgetragen.

Abbildung 51 zeigt, dass die Ribonukleoproteine erfolgreich rekonstituiert werden konnten. Tat allein schien während des Gelfiltrationslaufes degradiert zu werden, da ein monodisperser Peak nicht detektiert werden konnte.

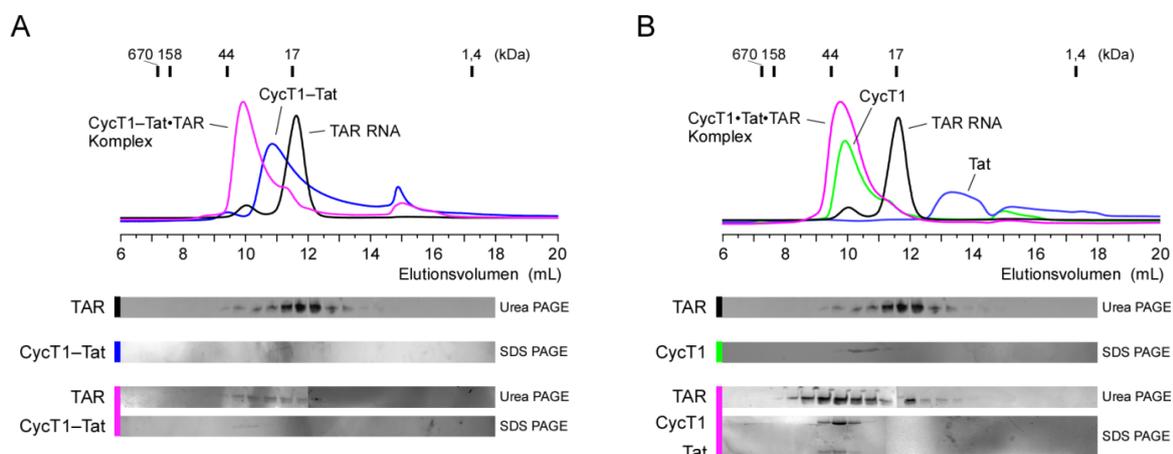


Abbildung 51: Komplexbildung von Cyclin T1, HIV-1 Tat und TAR mittels analytischer Gelfiltration und Analyse per SDS- bzw. Urea-PAGE. (A) Elutionsprofile des Cyclin T1/Tat Fusionsproteins, der TAR-RNA und des Komplexes beider Untereinheiten. 500 μ L-Fractionen jeden Laufs wurden gefällt und in SDS- und Urea-PAGE analysiert. (B) Elutionsprofile von Cyclin T1, Tat, TAR und des rekonstituierten Komplexes. Die Fraktionierung und Analyse erfolgte wie in (A). Für alle Gelfiltrationsläufe wurde eine Superdex 75-Säule in 20 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl und 1 mM TCEP verwendet (Bigalke et al., 2011).

Um die einzelnen Peaks auf ihre Zusammensetzung hin zu überprüfen, wurden während der Gelfiltrationsläufe Fraktionen gesammelt und per SDS- bzw. Urea-PAGE analysiert. Dadurch wurde gezeigt, dass die Komplexe korrekt assembliert werden konnten und dass alle Untereinheiten in ähnlicher Konzentration vorhanden waren. Natives HIV-1 Tat allein konnte im SDS-Gel nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt das an proteolytischer Degradation während des Gelfiltrationslaufs oder an einer Interaktion des Proteins mit der Säulenmatrix. In Verbindung mit Cyclin T1 und TAR konnte die aktivierende Untereinheit allerdings eluiert und angefärbt werden.

Eine kristallographische Analyse der Komplexe wird derzeit von Dr. Kanchan Anand, EMBL Heidelberg, durchgeführt.

4. DISKUSSION

Das transkriptionale Pausieren vor der produktiven Elongation hat sich in den letzten Jahren als genereller Mechanismus zur Regulation der mRNA-Produktion erwiesen (Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). P-TEFb stellt dabei einen zentralen Faktor dar, der positiv regulierend auf den Übergang von Transkriptionsinitiation zu -elongation wirkt. P-TEFb wird seinerseits durch die Interaktion mit Hexim1 und 7SK snRNA negativ reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von P-TEFb mit Hexim1 und der 7SK snRNA biochemisch und strukturell untersucht. Zusätzlich wurde die 7SK stabilisierende Komponente Larp7 des 7SK snRNPs auf ihre Interaktion mit 7SK und Hexim1 hin untersucht.

4.1 Regulation des P-TEFb Komplexes durch Hexim1

4.1.1 Strukturelle Untersuchung von Hexim1 TBD(Δ stammer)

Hexim1 inhibiert die Kinaseaktivität von P-TEFb durch einen bisher nicht aufgeklärten Mechanismus. Die Erkennung und Bindung von Hexim1 erfolgt dabei über die Cyclinboxen von Cyclin T1, während N-terminal gelegene Reste von Hexim1 vermutlich die ATP-Bindungstasche von Cdk9 blockieren (Czudnochowski, 2009). Die Bindung an Cyclin T1 wird über die TBD von Hexim1 vermittelt, woraufhin in dieser Arbeit der Komplex aus der TBD und den Cyclinboxdomänen von Cyclin T1 strukturell untersucht wurde.

Die Deletion des *stammer*-Motivs in Hexim1, welches die *coiled coil* Struktur der TBD unterbricht, führte zu einer Stabilisierung des Proteins (Schonichen et al., 2010) und wurde daher für die kristallographischen Untersuchungen verwendet. Während des Kristallisationsverfahrens präzipitierte die Cyclin T1-Untereinheit und allein Hexim1 TBD(Δ stammer) konnte kristallisiert werden. Die Struktur wurde mithilfe eines SAD-Datensatzes gelöst und zeigte eine kontinuierliche, parallele *coiled coil* Struktur. Die Deletion des *stammers* und der damit einhergehende Verlust an Flexibilität könnte ein Grund für die verminderte Affinität zu Cyclin T1 sein (Baumli et al., 2008; Schonichen et al., 2010). Es wird zwar angenommen, dass negativ geladene Reste des ersten *coiled coil* Abschnittes mit einem positiv geladenen Bereich zwischen den zwei Cyclinboxdomänen interagieren, möglicherweise ist aber das flexible *stammer*-Element,

welches die *coiled coil* Domäne unterbricht, zusätzlich notwendig, um eine stabile Interaktion mit humanem Cyclin T1 zu erzielen.

In Hexim2-Homologen gibt es statt eines *stammers* einen *stutter*, bei dem 3 statt 4 Reste in der Konsensussequenz fehlen (siehe Abbildung 17). *Stutter* führen im Gegensatz zu *stammer*-Motiven zu einer Unterdrehung des *coiled coils* (Lupas and Gruber, 2005). Demnach ist die axiale Orientierung beider *coiled coil*-Segmente zueinander vermutlich unwichtig für die Funktion von Hexim1. Dies wird zudem durch die Sequenzen von Fisch- und Frosch-Hexim1 unterstrichen. Diese beiden Proteinsequenzen gehen mit der Heptadperiodizität einher, jedoch ist ungewiss, ob ein durchgängiges *coiled coil* gebildet wird, da beispielsweise Prolin-Reste an den **a**- und **d**-Positionen zu finden sind. Proline werden als „Helixbrecher“ bezeichnet, da sie aufgrund des Ringschlusses am C_α-Atom nicht frei drehbar sind und die typische Winkelkonfiguration einer α -Helix nicht eingegangen werden kann. Die Amidgruppe des Prolins kann außerdem nicht als Donor von Wasserstoffbrückenbindungen agieren, was zu einer weiteren Destabilisierung der Helix führt. Dies könnte auch zu einer Unterbrechung der *coiled coil* Struktur führen. Daher können durch die gelöste Kristallstruktur, trotz der Deletion in der TBD (Δ stammer), wichtige Aussagen über Hexim1 getroffen werden.

Dem *coiled coil* ($\alpha 2\alpha 3$, $\alpha 2'\alpha 3'$) vorgelagert befinden sich zwei kleinere α -Helices ($\alpha 1$, $\alpha 1'$), die mit den Ketten des *coiled coils* interagieren (siehe Abbildung 21). Lys284 aus dem ersten *coiled coil* Segment ($\alpha 2$) ist hier ein zentraler Rest für die Ausbildung der Tertiärstruktur. Folgte man der Konsensussequenz eines *coiled coils*, befindet sich diese Aminosäure an einer **a**-Position. Mit der Aminogruppe der Seitenkette interagiert Lys284' allerdings mit den Rückgratcarbonylgruppen von Gln280 und Met282. Diese beiden Reste befinden sich an dem Übergang von $\alpha 2\alpha 3$ zu $\alpha 1$. Dadurch wird die Orientierung $\alpha 1$ -Helix maßgeblich beeinflusst. Eine Mutation von Lys284 zu Valin stimmt zwar mit der Konsensussequenz eines *coiled coils* überein, allerdings werden dabei diese wichtigen Kontakte zwischen $\alpha 2'\alpha 3'$ und $\alpha 1$ in der Ausbildung der Tertiärstruktur gestört. Dazu passen vorangehende Studien, die zeigen, dass eine K284V/Y291V-Mutante im Vergleich zur TBD(wt) nicht weiter stabilisiert ist (Schonichen et al., 2010).

Die Hexim1 TBD(Δ stammer) Kristallstruktur vervollständigt die Informationen über die Cyclin T-bindende Domäne, welche zuvor nativ als NMR-Struktur gelöst wurde (Dames et al., 2007). Die Interaktion der vorgelagerten Helices ($\alpha 1$, $\alpha 1'$) mit den Ketten des *coiled coils* ($\alpha 2\alpha 3$, $\alpha 2'\alpha 3'$) sind sehr spezifisch und hochkonserviert. Sie bestimmen den Verlauf des N-terminalen Bereichs von Hexim1 und zeigen, dass sich die Ketten hier voneinander trennen. Diese Trennung ist in Hinsicht auf die Inhibition von Cdk9 durch das PYNT-Motiv in Hexim1 (202-205) von großer Bedeutung. Nur eine Kette des N-

terminalen Abschnitts ist für die Inhibition von P-TEFb notwendig. Der genaue Verlauf der Kette auf dem P-TEFb-Komplex ist jedoch bisher noch nicht geklärt.

4.1.2 Interaktion von P-TEFb mit Hexim1

Um die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb näher zu untersuchen, wurden strukturelle Untersuchungen mit einem zur Inhibition fähigen minimalen Konstrukt von Hexim1 (194-316 bzw. 194-359) und P-TEFb durchgeführt (Czudnochowski, 2009). Aufgrund von ITC- und Gelfiltrationsexperimenten wird angenommen, dass das kürzere beider Hexim1-Konstrukte als Monomer an P-TEFb bindet (Schönichen et al., 2010). Dadurch sollte ein kompakter, ternärer Komplex gebildet werden, der sich für die Kristallisation eignete. Zusätzlich wäre ein Vergleich beider Strukturen – P-TEFb mit Hexim1-Dimer bzw. -Monomer – von Interesse. Trotz initialer, kleiner Kristalle konnte bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch keine Kristallstruktur des kleinen, inhibierten P-TEFb-Komplexes ermittelt werden.

Die Komplexe wurden daher per Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Hierbei konnte die *ab initio* Struktur des größeren Komplexes mit Hexim1 (194-359) berechnet werden. Aufgrund unvollständiger Modelle, konnten die bekannten Kristall- und NMR-Strukturen P-TEFb und Hexim1 TBD(wt) nicht durch eine automatisierte *rigid body* Modellierung der Volumenkarte angepasst werden. Zudem kann man annehmen, dass das *stammer*-Motiv als flexibles Element innerhalb der TBD eine Konformationsänderung der starren *coiled coil* NMR-Struktur bei Bindung an P-TEFb herbeiführt. Eine manuelle Anpassung mithilfe des Programms PyMOL ermöglichte die Erstellung eines vorläufigen Modells des P-TEFb/Hexim1-Komplexes (siehe Abbildung 52).

Dem Modell entsprechend würden Aminosäuren des ersten *coiled coil* Segments von Hexim1 (285-315) vielfältige Interaktionen mit Cyclin T1 eingehen. Der sich daran anschließende N-terminale Bereich ist wahrscheinlich sehr flexibel und nur teilweise mit P-TEFb assoziiert. Das für die Inhibition notwendige PYNT-Motiv (202-205) befindet sich möglicherweise in der ATP-Bindungstasche von Cdk9 und verhindert so die Kinaseaktivität. Auch dem Tyr271-Rest aus Hexim1 wurde eine essentielle Rolle bei der P-TEFb-Inhibition zugeschrieben (Li et al., 2005). Die Autoren gingen davon aus, dass das Tyrosin ähnlich dem p27^{KIP1} Inhibitor (Pavletich, 1999) durch Nachahmung der Puringruppe die ATP-Bindungstasche blockiert. Bindungsstudien von Dr. André Schönichen ergaben, dass eine Y271A Mutante nicht mehr in der Lage war an Cyclin T1 zu binden (unveröffentlichte Daten). In dem vorliegenden Modell wäre Tyr271 weit von der ATP-Bindungstasche entfernt (siehe Abbildung 52), allerdings nahe der Cyclinboxdomänen von Cyclin T1. Vermutlich bildet Tyr271 einen kritischen Kontakt mit einem oder mehreren Resten in der ersten Cyclinboxdomäne von Cyclin T1. Eine

Mutation zu Alanin würde diesen Kontakt stören, die Bindung beeinträchtigen und somit gäbe es auch keine Inhibition wie von Li et al. beschrieben.

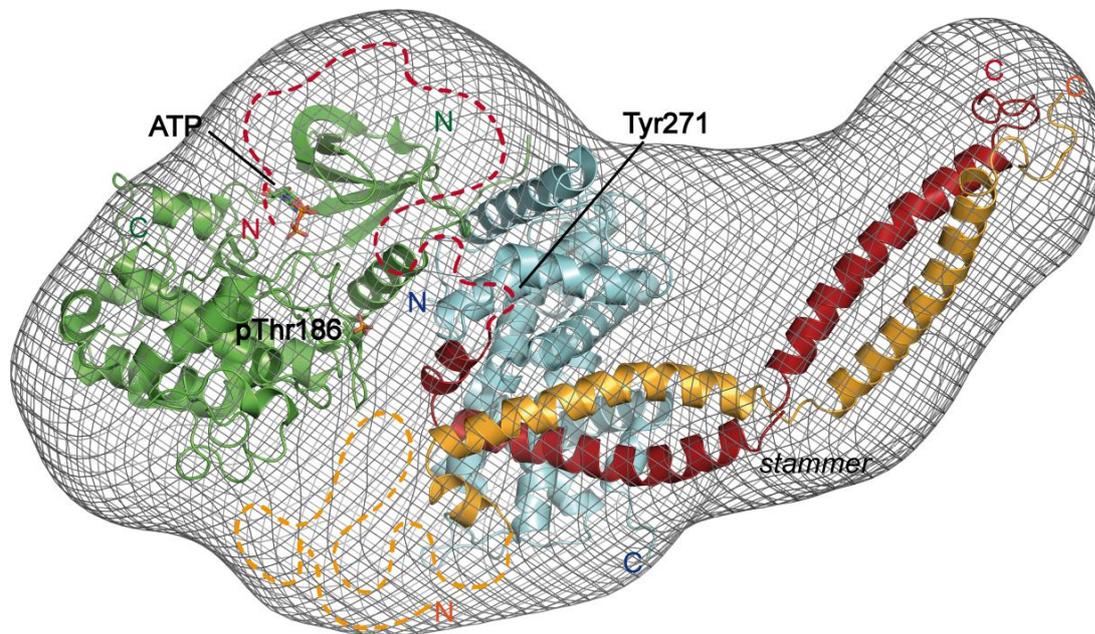


Abbildung 52: Modell der P-TEFb-Inhibition durch Hexim1 (194-359). Kristallstrukturen von P-TEFb (grün/blau) und der Hexim1 TBD(wt) (rot/gelb) wurden mithilfe des Programms PyMOL manuell an die *ab initio* berechnete Volumenkarte angepasst. Dazu wurde die TBD unter der Annahme, dass der stammer ein flexibles Element darstellt, in zwei Teile unterteilt und in einem Winkel von $\sim 130^\circ$ zueinander positioniert, so dass sie bestmöglich in die berechnete Volumenkarte passt. Die Hexim1-Struktur umfasst Reste 274-359. Die fehlenden 80 N-terminalen Reste sind vermutlich sehr flexibel. Sie sind hier durch gestrichelte Linien modelliert (pdb-Codes: 2GD7, 3BLQ; Dames et al., 2007; Baumli et al., 2008).

Die Deletion des C-terminalen *coiled coil* Segments von Hexim1 (317-359) bewirkt eine Auflösung der dimeren Struktur (Schonichen et al., 2010), so dass ein 1:1:1 Komplex mit Cdk9 und Cyclin T1 gebildet wird. Das entwickelte Modell würde auch zu diesen Daten passen, da die Interaktionen zwischen dem C-terminalen *coiled coil* Segment und Cyclin T1 ausschließlich über eine α -Helix ablaufen (hier in rot dargestellt). Die kürzere Hexim1 Mutante ist also noch in der Lage Cyclin T1 zu binden, als auch Cdk9 zu inhibieren.

Das Modell ist überdies mit Daten von Schulte et al. in Einklang, die in dem Cyclin T1/Hexim1 TBD(wt) Komplex eine Verdrängung der TBD durch HIV-1 Tat vorschlugen (Schulte et al., 2005). Ein Vergleich mit der P-TEFb/Tat-Struktur (siehe Abbildung 14B) zeigt, dass die Interaktionsfläche zwischen Cyclin T1 und Tat mit der Fläche zwischen Cyclin T1 und Hexim1 überlappen würde (Tahirov et al., 2010). Dadurch kann erklärt werden, warum P-TEFb ausschließlich in Hexim1- bzw. Tat-gebundener Form vorliegt und kein quartärer Komplex gebildet wird.

4.2 Die 7SK snRNA-Larp7 Interaktion

Ein maßgeblicher Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von Larp7 mit 7SK snRNA. Mittels analytischen Gelfiltrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Heparin ein stabiler Komplex aus 7SK snRNA und Larp7 gewonnen werden kann. Für eine stabile Faltung der RNA war ein vorheriges Aufheizen auf 80°C unerlässlich. Durch isothermale Titrationskalorimetrie konnte gezeigt werden, dass Larp7 mit nanomolarer Affinität an die 7SK bindet ($K_d = 172$ nM). Beliebige, unspezifisch bindende RNA wurde mit einer etwa 20-fach schwächeren Affinität gebunden. Die ITC-Messungen sind auffällig, weil sie sehr große Amplituden der Integrale aufweisen. Diese sind bei Protein-RNA-Interaktionen im Gegensatz zu Protein-Protein-Interaktionen üblich (Feig, 2007). Die gemessene Enthalpieänderung enthält schon bei relativ niedrigen Temperaturen sowohl eine Bindungs- als auch eine Faltungskomponente. Höchstwahrscheinlich gehen sowohl Larp7 als auch 7SK snRNA bei der Bindung aneinander weitreichende Konformationsänderungen ein

Die freie Enthalpie ΔG liegt sowohl bei der spezifischen Bindung der 7SK als auch bei der unspezifischen Bindung der TAR durch Larp7 im negativen Bereich, woraus sich schließen lässt, dass beide Reaktionen spontan ablaufen. Dies ist bei der Larp7-TAR-Bindung aufgrund der endothermen Reaktion nur durch einen starken Zuwachs an Entropie möglich. Das molare Verhältnis mit $n = 0,54$ bei dieser Bindungsreaktion deutet eher auf einen 2:1 (TAR RNA:Larp7) Komplex hin. Möglicherweise binden hier die RNA-erkennenden Domänen von Larp7 individuell mit ähnlichem K_d und ΔH an die RNA, da die Integrationskurve mit einem Ein-Schritt Bindungsmodell angepasst werden konnte. Die Integrationskurve von Larp7 zu 7SK wurde auch mit einem Ein-Schritt Bindungsmodell gefittet, obwohl sich mindestens drei RNA-bindende Motive in dem Protein befinden. Das bedeutet mit Hinsicht auf das molare Verhältnis mit $n = 0,90$, dass sich trotz der vielfältigen RNA-bindenden Domänen ein 1:1-Komplex ausbildet. Sowohl das LAM als auch die RRM1 eines Larp7s binden an dasselbe RNA-Molekül. Derzeit ist nur von LAM und RRM1 bekannt, welcher Teil der 7SK erkannt und gebunden wird. Hierbei handelt es sich für beide Domänen um das 3' Polyuridin-Ende (besprochen in Bayfield et al., 2010). Die Bindungsstellen für weitere RRMs sind noch unbekannt.

Die ITC-Messungen deuten aufgrund der hohen Amplituden der Wärmetönung darauf hin, dass die RNA bei Bindung an Larp7 intensiven Konformationsänderungen unterliegt. Die 7SK spielt bei Bindung an verschiedene Interaktionspartner wie Larp7, Hexim1 und P-TEFb die Rolle eines molekularen Schalters. Jede Bindung, die die 7SK eingeht, ist vermutlich mit einer Konformationsänderung verbunden, ähnlich den sog. *riboswitches* in nicht-translatierten Regionen von mRNAs. Der Thiaminpyrophosphat

(TPP) *riboswitch* ist beispielsweise ein hochkonserviertes RNA-Sekundärstrukturelement, welches durch Bindung an Thiaminpyrophosphat die Thiamin-Biosynthese und dessen Transport reguliert (Winkler et al., 2002). Basierend auf einer Strukturvorhersage der 7SK snRNA durch mFold (Washington University) kann man von mehreren strukturellen Anordnungen der RNA mit ähnlicher freier Energie ΔG ausgehen. Eine strukturelle Änderung bei Bindung verschiedener Interaktionspartner erscheint naheliegend.

Die hohe Affinität von Larp7 zu 7SK im Vergleich zu anderen ncRNAs bietet eine Erklärung für die Beobachtung, dass 7SK in der Zelle fast ausschließlich in Larp7-gebundener Form vorliegt (besprochen in Bayfield et al., 2010). Larp7 schützt die RNA vor Degradation durch Exonukleasen und erhöht gleichzeitig die Stabilität. Dies ist vermutlich auf die Stabilisierung einer definierten Konformation der 7SK zurückzuführen. Thermale Denaturierungskurven zeigen jedoch, dass die 7SK-Bindung auch die thermale Stabilität von Larp7 erhöht. In Anwesenheit der RNA wurde der Schmelzpunkt von 43°C auf 61°C verschoben. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Faltung von Larp7 durch Bindung an 7SK snRNA beeinflusst wird. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass die RNA-bindenden Domänen von humanem La (LAM und RRM1) in Abwesenheit von RNA unabhängig voneinander existieren, d.h. dass sie keine Bindung eingehen und nur über einen Linker miteinander verbunden sind (Kotik-Kogan et al., 2008). Dadurch ist das Protein sehr flexibel und erst durch Bindung einer RNA kann es die stabilisierende und schützende Faltung einnehmen. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch bei Larp7 denkbar. Die Flexibilität des Proteins in Abwesenheit von RNA erscheint in Anbetracht der SAXS-Daten und der DLS-Ergebnisse naheliegend. Dadurch ist das Protein jedoch auch weniger stabil und liegt schon bei einer Temperatur von 43°C zur Hälfte ungefaltet vor. Die Bindung an Nukleotidketten der 7SK snRNA verhilft Larp7 zu einer stabilen Faltung und kann so die Schmelztemperatur um fast 20 K erhöhen.

Die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung in Zusammenhang mit einer Strukturvorhersage von Larp7 ergaben, dass sich möglicherweise 5 statt 3 RNA-Bindungsdomänen in dem Protein befinden (siehe Abschnitt 3.3.1). Daraufhin wurden neue Larp7-Konstrukte generiert, deren Bindungsverhalten an 7SK snRNA mithilfe von elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstests untersucht wurde. Die N-terminalen Konstrukte, die auch das LAM und RRM1 enthielten, interagieren sowohl mit dem 3'-Polyuridin-Ende von 7SK als auch mit den Enden anderer ncRNAs (He et al., 2008). In Abbildung 53A ist ein Sequenzalignment der LAM- und RRM1-Domänen von humanem La und Larp7 dargestellt. Insbesondere das LAM beider Proteine weist eine hohe Sequenzidentität auf. Abbildung 53B zeigt den Komplex aus La-LAM und -RRM1 und einem Polyuridinabschnitt. Die an der Bindung beteiligten Reste im LAM sind in rot

Weiterhin würde dieser Bereich durch Bindung an die RNA diese vermutlich auch vor Degradation durch Exonukleasen schützen. Eine Deletion des C-terminalen Bereichs von Larp7 verhindert die 7SK snRNP-Assemblierung (He et al., 2008), während Defekte in dem LAM nur geringe Störungen hervorrufen (Markert et al., 2008).

Eine vollständige Verschiebung der 7SK snRNA durch die neu generierten Larp7-Konstrukte in den EMSAs konnte ab einem Verhältnis von 2:3 (RNA:Protein) beobachtet werden. Die C-terminalen Larp7-Konstrukte führten schon bei äquimolarem Einsatz zu einer vollständigen Verschiebung der RNA im Gel. Einerseits könnte dies an der Reinheit der Proteine liegen, die bei den C-terminalen Konstrukten im Vergleich zu den anderen Konstrukten leicht erhöht war. Dies könnte jedoch auch darauf hinweisen, dass die Spezifität der 7SK RNA-Bindung in Domänen des C-terminalen Bereichs von Larp7 begründet liegt. Das LAM und RRM1 erkennen das Polyuridinende der RNA, während weitere mögliche RRMs spezifische 7SK snRNA-Sequenzen erkennen und binden. Weitere biochemische und strukturelle Studien sind notwendig, um die Larp7-7SK-Interaktion hinsichtlich des Erkennungsmechanismus zu klären. Zudem ist noch unklar, ob die zusätzlichen RRMs einzel- oder doppelsträngige RNA binden und ob die Erkennung Sequenz- oder Sekundärstruktur-spezifisch ist. Die Strukturvorhersagen durch mFold haben jedoch gemein, dass das 3'-Ende der 7SK snRNA in einzelsträngiger Form vorliegt und somit für die Larp7-Bindung (LAM und RRM1) im vorgeschlagenen Modus zugänglich ist.

Das Bindungsverhalten der N-terminalen Larp7-Konstrukte mit den synthetisierten RNA-Oligonukleotiden Union1 und Union2 wich etwas von den Ergebnissen der Mobilitätsverschiebungstests ab. Union1 und Union2 wurden nach dem Vorbild des 3'-Endes der 7SK snRNA generiert, so dass eine spezifische Interaktion mit Larp7 stattfindet. Das kürzeste Larp7-Konstrukt (24-248) zeigte nach analytischer Gelfiltration eine schwächere Bindung an Union2, als nach den EMSAs zu vermuten wäre. Union1 hingegen wurde bei einem eingesetzten RNA:Protein-Verhältnis von 2:3 vollständig gebunden. Demnach scheint das Union2-Konstrukt, vermutlich aufgrund der höheren Sequenzabweichung von dem 7SK snRNA 3'-Ende, ein schwächerer Interaktionspartner zu sein. Zudem konnte durch die Gelfiltrationsexperimente gezeigt werden, dass kein Dimer des Protein/RNA-Komplexes gebildet wurde. Möglicherweise hätte eine solche Dimerisierung wie bei Teplova et al. beim Kristallisationsverfahren durch das Packungsverhalten und die hohe Konzentration der Moleküle stattfinden können (Teplova et al., 2006). In Lösung war die Tendenz der Oligonukleotide, einen Doppelstrang auszubilden, jedoch nicht stark genug

4.2.1 Interaktion von Larp7 mit Hexim1 und BCDIN3

Durch analytische Gelfiltrationsexperimente konnte gezeigt werden, dass Larp7 nur über Interaktion mit 7SK einen Komplex mit Hexim1 bildet. 7SK snRNA ist demnach das zentrale Element des 7SK snRNPs, da es zusätzlich auch mit P-TEFb interagiert. Die Kinaseaktivität von P-TEFb wird in Anwesenheit von Hexim1 auf 28% relativ zu der nicht inhibierten Aktivität verringert, während die Zugabe von 7SK snRNA diese Inhibition noch verstärken konnte (3% Aktivität; Czudnochowski, 2009). Möglicherweise hebt 7SK durch Bindung an das zentrale basische Element in Hexim1 den autoinhibierten Zustand von Hexim1 auf und erleichtert somit die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb. Als Gerüstmolekül stabilisiert 7SK wahrscheinlich auch die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb.

In der Literatur wurde eine Interaktion zwischen der Methyltransferase BCDIN3 und Larp7 beobachtet (Xue et al., 2010). BCDIN3 methyliert das γ -Phosphat des 7SK snRNA 5'-Endes (Jeronimo et al., 2007). Diese sog. *Cap*-Struktur erhöht die Stabilität der 7SK im Vergleich zu unmodifizierter RNA um ein Vielfaches (Shumyatsky et al., 1993). Die Autoren Xue et al. beschreiben eine Interaktion des katalytischen Zentrums der

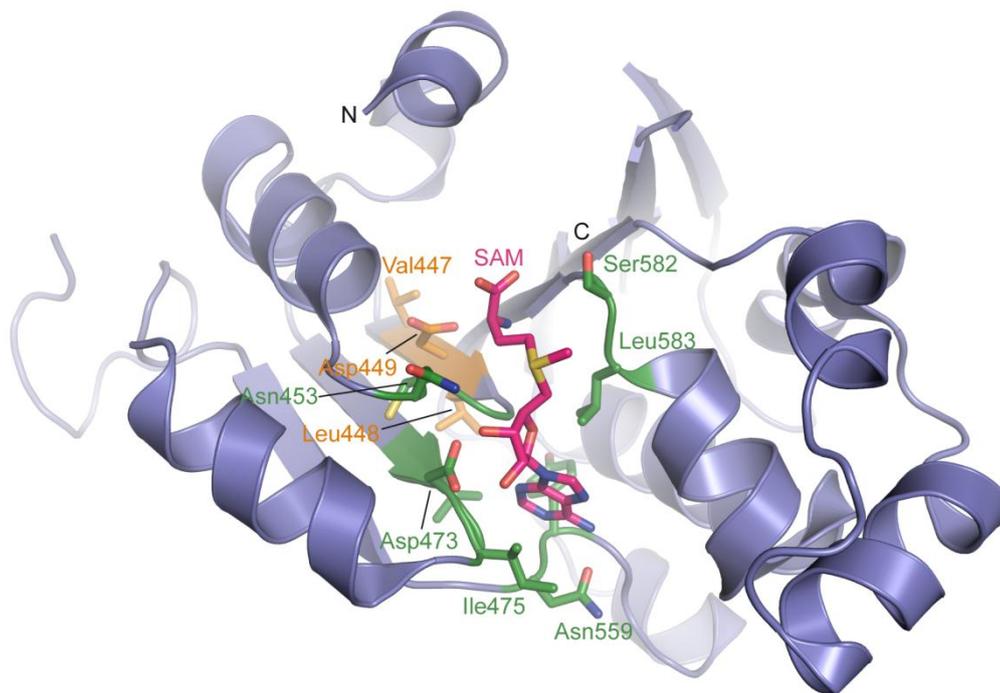


Abbildung 54: Kristallstruktur der Methyltransferasedomäne von BCDIN3 im Komplex mit SAM. Die an der unmittelbaren Bindung von SAM (pink) beteiligten Reste sind in grün dargestellt. Die für die Bindungsstudien mit Larp7 mutierten Reste sind in orange zu sehen (Xue et al., 2010). Der geringste Abstand zwischen dem Kosubstrat SAM und einer der mutierten Resten besteht zwischen der Carboxylgruppe von Asp449 und der Aminogruppe in SAM. Der Abstand beträgt hier 4,7 Å, was für eine elektrostatische Interaktion nicht ausreichend ist (pdb-Code: 3G07).

Methyltransferasedomäne von BCDIN3 mit Larp7. Sie konnten zeigen, dass bei Mutation der katalytischen Reste 447-449 (Val, Leu, Asp) keine Interaktion mit Larp7 mehr stattfand. Um die Bindung beider Proteine näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit analytische Gelfiltrationsexperimente mit Larp7 (24-555) und der Transferasedomäne von BCDIN3 (400-689) durchgeführt. Es konnte jedoch keine Interaktion der beiden Proteine beobachtet werden. Möglicherweise ist die Methyltransferasedomäne von BCDIN3 für die Larp7-Bindung nicht ausreichend und die beobachtete Interaktion findet über Reste innerhalb des N-terminalen Bereichs von BCDIN3 statt. Eine andere Erklärung für die beobachtete Komplexbildung könnte die unspezifische Bindung von RNA durch die Proteine bieten. Beide Proteine könnten über unspezifisch gebundene RNA indirekt miteinander interagieren. Da in dieser Studie beide Proteine RNA-frei gereinigt wurden, was durch finale Messungen des A_{260}/A_{280} -Verhältnisses bestätigt werden konnte, konnte eine solche Interaktion selbstverständlich nicht beobachtet werden. Eine Analyse der Kristallstruktur der Methyltransferasedomäne von BCDIN3 (siehe Abbildung 54) ergab, dass die Autoren vermutlich nicht katalytische Reste, sondern strukturgebende Reste des Enzyms mutierten. Val447, Leu448 und Asp449 sind an der SAM-Bindung nicht direkt beteiligt und daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die dreifache Mutation die gesamte Struktur der Proteins beeinflusst wurde. Es bleibt weiterhin unklar, ob ein stabiler Larp7/BCDIN3-Komplex gebildet wird. Eine Analyse des vollständigen BCDIN3 würde mehr Aufschlüsse darüber geben, allerdings konnte das Volllängen-Protein trotz wiederholter Versuche nicht in *E. coli* exprimiert werden.

Weiterhin konnte kein stabiler, stöchiometrischer Komplex aus der Methyltransferasedomäne von BCDIN3 und 7SK generiert werden. Auch die Anwesenheit des Kosubstrats SAM bzw. des Reaktionsinhibitors SAH zeigte keinen Einfluss auf die Komplexbildung. Dies könnte darauf hinweisen, dass BCDIN3 keine stabile Untereinheit des 7SK snRNPs ist, wie es zuvor vorgeschlagen wurde (Jeronimo et al., 2007; Xue et al., 2010). Nach der enzymatischen Reaktion würde BCDIN3 die 7SK verlassen und die Interaktion der RNA mit Larp7 stimulieren. Eine weitere mögliche Erklärung für die unvollständige Komplexbildung ist auch hier die Verwendung des unvollständigen BCDIN3s. Die 7SK-BCDIN3-Interaktion könnte durch Aminosäuren in dem N-terminalen Bereich des Proteins (1-400) stabilisiert werden, welcher zudem hochgradigen posttranslationalen Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen unterliegt.

4.3 Rekonstitution des 7SK snRNPs

Die Rekonstitution des vollständigen 7SK snRNPs sollte Aufschlüsse über die strukturelle Anordnung des Komplexes geben. Initiale Versuche, den Komplex mittels Größenausschlusschromatographie zu assemblieren, zeigten, dass alle Untereinheiten in einer Fraktion eluiert werden konnten und damit der rekonstituierte Komplex für weitere Studien geeignet war. Der Komplex konnte in initialen Experimenten über negative Färbung im Elektronenmikroskop visualisiert werden. Es zeigte sich jedoch, dass es sich um eine sehr heterogene Probe handelte. In der Probe lagen verschiedene Komplexe bzw. Konformationen vor, wodurch eine strukturelle Analyse erschwert wurde. Von diesen Aufnahmen wurden jedoch dennoch initiale Klassensummen bestimmt und ein vorläufiges 3D-Modell berechnet. Dieses Modell ist aufgrund der Heterogenität der Probe jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Die berechnete Größe des 3D-Modells legt einen dimeren Proteinkomplex nahe und beherbergt eine 2-fache Symmetrie. Dies widerspricht bestehenden biochemischen Daten (Schonichen et al., 2010), die besagen, dass ausschließlich Hexim1 als Dimer vorliegt und einen Komplex mit den Monomeren von Cdk9, Cyclin T1, 7SK und Larp7 bildet. Da in dieses neue Modell, aufgrund der Unsicherheit des Modells, bisher keine Kristallstrukturen gefittet werden konnten, ist noch unklar, ob alle Untereinheiten in dem Komplex vereint waren. Möglicherweise ist P-TEFb im Laufe des GraFix-Verfahrens dissoziiert und bei dem beobachteten Komplex handelt es sich um den Subkomplex aus Hexim1, 7SK und Larp7. Beobachtungen aus analytischen Gelfiltrationsexperimenten ergaben, dass dieser Komplex aufgrund des hohen Molekulargewichts durchaus als Dimer vorliegen könnte (siehe Abbildung 39). Dabei könnten pro Hexim1-Molekül je eine 7SK snRNA und ein Larp7 gebunden sein. In dem vollständigen, inhibierten Komplex erscheint dies unwahrscheinlich, da Hexim1 vermutlich asymmetrisch an P-TEFb gebunden ist (siehe Abbildung 55). Dabei bindet die TBD als Dimer an Cyclin T1 und ein Hexim1-Monomer ist für die Inhibition von Cdk9 notwendig (siehe Abbildung 52). In diesem Modell kann kein zweites P-TEFb-Molekül zusätzlich gebunden werden. In Abwesenheit von P-TEFb ist diese Asymmetrie nicht vorhanden und eine Dimerisierung der drei Untereinheiten scheint daher möglich. Es verbleibt Gegenstand der Forschung diese Modelle durch strukturbiochemische Analysen zu bestätigen.

Weitere Versuche, ein homogenes und vollständiges 7SK snRNP für Einzelpartikel Cryo-EM Aufnahmen zu rekonstituieren, führten zu einer neuen Reinigungsstrategie der einzelnen Komponenten. Zum einen kann das Einfrieren der Proteine zu einer Verschlechterung der Probe führen und sogar die Disassemblierung des Komplexes herbeiführen. Proteine können bei längerer Lagerung auch bei niedrigen Temperaturen irreversible Schäden erleiden und präzipitieren. Weiterhin sollte das 7SK snRNP keiner

Größenausschlusschromatographie unterzogen werden, da diese Methode für die Präparation von EM-Proben durch Scherkräfte und andere Effekte zu harsch ist und zur Schädigung der RNA und des gesamten Komplexes führen kann. Daher wurden alle Komponenten vor der Gradientenzentrifugation frisch präpariert und nach einem schonenden Reinigungsverfahren über Affinitätsanker miteinander assembliert (siehe Abschnitt 3.4). Der so präparierte Komplex wies in der SDS-PAGE Analyse gleich-dicke Banden der Untereinheiten Cdk9, Cyclin T1 und Larp7 auf, während die Bande von Hexim1 aufgrund der dimeren Struktur leicht dicker war. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Komplex von hoher Reinheit war

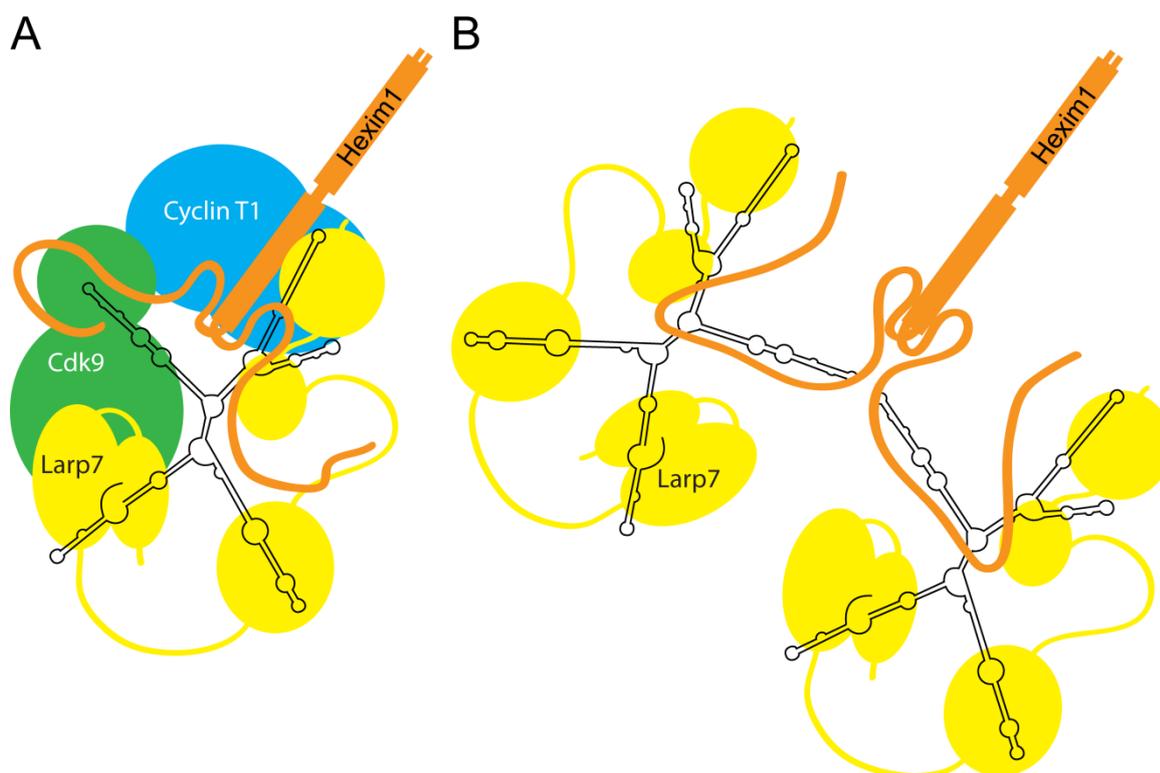


Abbildung 55: Modell des 7SK snRNPs (A) und des Subkomplexes aus Hexim1, 7SK snRNA und Larp7 (B). (A) Aufgrund bestehender Daten wird davon ausgegangen, dass Hexim1 als Dimer in dem Komplex enthalten ist, während die anderen Untereinheiten in monomerer Form vorliegen. (B) In Abwesenheit von P-TEFb scheint ein Dimer von Heterotrimeren möglich. Analytische Gelfiltrationsexperimente unterstützen dies.

Um eine weitere Verbesserung der Stabilität zu erreichen, wurde der große inhibierte Komplex Thermofluormessungen unterzogen. Die Messungen ergaben, dass das 7SK snRNP bei neutralem pH-Wert unter Nutzung der Puffersubstanz Hepes thermal stabil war. Zusätzlich konnte ermittelt werden, dass Glycerol keine geeignete Substanz für die Gradientenzentrifugation darstellte. Für alle weiteren Experimente wurde daher Sucrose als Zucker beim GraFix verwendet. Desweiteren wurden die Additive TCEP und Magnesiumchlorid in geringerer Konzentration verwendet. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten allerdings keine verlässlichen EM-Aufnahmen des 7SK snRNPs gemacht

werden. Unter Berücksichtigung der ermittelten Verbesserungen der Komplex-Rekonstitution erscheint es jedoch möglich, dass in Zukunft auch eine Verbesserung der EM-Datenaufnahme erreicht werden kann und damit ein verlässliches Modell des 7SK snRNP ermittelt wird.

4.4 Rekonstitution des Cyclin T1/Tat/TAR-Komplexes

Die Rekonstitution des viral aktivierten Cyclin T1/HIV-1 Tat/TAR-Komplexes wurde mittels analytischer Gelfiltration durchgeführt. Zur Überprüfung der im Komplex enthaltenen Untereinheiten wurden Fraktionen im SDS- und Ureagel untersucht. Sowohl der Komplex aus den einzelnen Untereinheiten Cyclin T1, Tat und TAR, als auch der Komplex aus dem Fusionskonstrukt Cylin T1-Tat und TAR konnten stöchiometrisch assembliert werden. Tat allein zeigt weder einen definierten Peak, noch konnte es im SDS-Gel detektiert werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Tat während des Gelfiltrationslaufs degradiert wurde oder das Protein mit der Säulenmatrix interagiert und daher nicht eluiert werden konnte. Auch Cyclin T1 zeigt ein ungewöhnliches Laufverhalten. Es eluiert sehr früh, was mit einem höheren Molekulargewicht einhergeht. Möglicherweise sind die N- und C-terminalen Helices, die nicht zu den typischen Cyclinboxwiederholungen gehören, flexibel und erhöhen so den hydrodynamischen Radius des Proteins. In Verbindung mit Tat und TAR eluierte der Cyclin T1 Komplex allerdings der Größe entsprechend. Dies würde mit vorherigen Ergebnissen einhergehen, die zeigten, dass die Interaktion von Cyclin T1 mit Tat oder Hexim1 die Cyclinboxfaltung stabilisieren (Anand et al., 2007; Dames et al., 2007).

Die Assemblierung des viral aktivierten RNP-Komplexes ist ein erster Schritt zur strukturellen Aufklärung der Interaktion zwischen humanem Cyclin T1 und HIV-1 Tat und TAR. Weitere Analysen würden zum Verständnis der spezifischen Bindung des zellulären Proteins mit den viralen Interaktionspartnern beitragen und könnten möglicherweise Angriffspunkte potentieller antiviraler Medikamente aufzeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von P-TEFb durch Hexim1 und 7SK snRNA und die Interaktion der RNA mit Larp7 untersucht. Die strenge Kontrolle der mRNA-Produktion durch Regulation von P-TEFb ist absolut essentiell für normales Wachstum und Entwicklung der Zelle. Der Mechanismus der P-TEFb-Inhibition ist bis heute nicht exakt aufgeklärt. Die vorliegenden Ergebnisse bieten eine Grundlage für die weitere strukturelle Analyse des 7SK snRNPs.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Transkriptionsprozess wird in eukaryotischen Zellen streng kontrolliert. Kurz nach der Initiation pausiert die RNA Polymerase II bei etwa 80% aller Gene. Diese Pause ist für die Prozessierung der prä-mRNA notwendig und stellt einen wichtigen Kontrollpunkt für die Genexpression dar. Ein zentraler Faktor, der die Polymerase in die produktive Elongationsphase überführt, ist P-TEFb. P-TEFb besteht aus der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk9 und Cyclin T1. Der Komplex phosphoryliert die C-terminale Domäne (CTD) der größten RNA Polymerase II-Untereinheit Rpb1. Die humane CTD besteht aus 52 nahezu exakten Wiederholungen der Sequenz YSPTSPS. Die Phosphorylierung durch P-TEFb erfolgt an der Serin 2-Position. Zudem phosphoryliert P-TEFb die negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF. Durch diese Modifikationen wird das Promoterproximale Pausieren aufgehoben und die RNA Polymerase II kann in die produktive Elongationsphase übergehen.

P-TEFb muss jedoch auch negativ reguliert werden, um eine übermäßige Genexpression zu vermeiden. Hexim1 inhibiert die Kinaseaktivität von P-TEFb im Zusammenspiel mit der kleinen nukleären RNA 7SK über einen bisher unbekanntenen Mechanismus. 7SK ist wiederum an den RNA stabilisierenden Faktor Larp7 gebunden. Diese 5 Untereinheiten konstituieren das 7SK snRNP mit einem Molekulargewicht von etwa 400 kDa. Zur Aktivierung der Kinase wird P-TEFb von dem Bromodomänenenthaltenden Protein Brd4 gebunden und zum Transkriptionsstart rekrutiert. Fehlregulationen von P-TEFb sind an der Herzmuskelzellhypertrophie und der Entstehung verschiedener Krebsarten maßgeblich beteiligt. Zudem ist P-TEFb ein Angriffspunkt des Transaktivatorkomplexes Tat/TAR des humanen Immundefizienzvirus 1, wodurch eine Stimulation der Transkription von viraler DNA erreicht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die negative Regulation von P-TEFb durch Hexim1 und 7SK snRNA und die Interaktion von 7SK und Larp7 untersucht. Es konnte eine stabilisierte Mutante der Cyclin-bindenden Domäne von Hexim1 kristallisiert werden. Das Protein bildet eine parallele *coiled coil*-Struktur mit zwei kleineren vorgelagerten Helices aus, die intensive Kontakte mit den gegenüberliegenden Helices des *coiled coils* eingehen. Die Interaktionen bestimmen den weiteren Verlauf des N-terminalen Bereichs von Hexim1, welcher für die Inhibition von P-TEFb verantwortlich ist.

Zwei minimal inhibierte Komplexe bestehend aus P-TEFb und Hexim1 (194-316/194-359) wurden per Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Die *ab initio* Strukturbestimmung des Größeren der beiden Komplexe ermöglichte die Entwicklung eines

Modells, welches zur Klärung des Inhibitionsmechanismus durch Hexim1 beitragen könnte.

Die 7SK snRNA wird durch Bindung von Larp7 vor Degradation geschützt und stabilisiert. Analytische Gelfiltrationsexperimente ergaben, dass die Zugabe von Heparin zu dem Larp7-7SK-Komplex unspezifische Protein-RNA-Kontakte verhindert und eine stöchiometrisch korrekte Assemblierung ermöglicht. Durch isothermale Titrationskalorimetrie konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen beiden Komponenten mit einer Dissoziationskonstante von 170 nM sehr stark ist. Im Vergleich wurde unspezifische RNA von Larp7 etwa 20-fach schlechter gebunden. Thermale Denaturierungskurven zeigten, dass Larp7 nicht nur die 7SK snRNA stabilisiert sondern dass die Anwesenheit von RNA auch die thermale Stabilität von Larp7 erhöht. Vermutlich agiert die RNA hier als eine Art Chaperon, welches die Faltung von Larp7 begünstigt. Die Struktur von Larp7 wurde mithilfe von Kleinwinkelstreuung *ab initio* berechnet. Ein Vergleich der Volumenkarte mit einer Strukturvorhersage von Larp7 wies eine große Ähnlichkeit auf. Aufgrund dieser strukturellen Daten konnte man annehmen, dass nicht nur 3 RNA-bindende Domänen in Larp7 vorhanden sind, sondern sich 5 dieser Domänen in dem Protein befinden. Basierend auf diesen Daten wurden neue Proteinkonstrukte entworfen und produziert und auf ihre Interaktion mit der 7SK snRNA hin untersucht. Die Daten legen nahe, dass die spezifische Bindung der 7SK snRNA über Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Proteins erfolgt. Eine Kristallstruktur der Larp7-RNA-Komplexe konnte bisher jedoch nicht ermittelt werden.

Weiterhin konnte das vollständige 7SK snRNP, bestehend aus Cdk9, C-terminal verkürztem Cyclin T1, Hexim1, 7SK snRNA und Larp7, mit einem Molekulargewicht von über 320 kDa rekombinant assembliert werden. Mit dem Komplex wurden primäre strukturelle Daten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gesammelt. Eine Verbesserung der Rekonstitution wurde durch Optimierung der Reinigungsstrategie und eine Thermofluor-Analyse erreicht.

Die Rekonstitution des viral aktivierten Komplexes aus Cyclin T1, HIV-1 Tat und TAR wurde mithilfe von Gelfiltrationsexperimenten durchgeführt. Ein stöchiometrischer, reiner Komplex, der für kristallographische Untersuchungen geeignet war, konnte so assembliert werden. Eine Analyse durch SDS- und Urea-PAGE ergab, dass sowohl ein Fusionskonstrukt aus Cyclin T1 und Tat, als auch die jeweils einzelnen Komponenten einen stabilen Komplex mit der TAR RNA bilden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bieten eine Grundlage für die strukturelle Analyse des 7SK snRNPs, als auch des viral aktivierten P-TEFbs.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* **13**, 67-76.
- Akhtar, M.S., Heidemann, M., Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Chapman, R.D., Eick, D., and Ansari, A.Z. (2009). TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* **34**, 387-393.
- 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.
- Ammosova, T., Berro, R., Jerebtsova, M., Jackson, A., Charles, S., Klase, Z., Southerland, W., Gordeuk, V.R., Kashanchi, F., and Nekhai, S. (2006). Phosphorylation of HIV-1 Tat by CDK2 in HIV-1 transcription. *Retrovirology* **3**, 78-98.
- 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.
- Andersen, G., Busso, D., Poterszman, A., Hwang, J.R., Wurtz, J.M., Ripp, R., Thierry, J.C., Egly, J.M., and Moras, D. (1997). The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *EMBO J* **16**, 958-967.
- Andersen, G., Poterszman, A., Egly, J.M., Moras, D., and Thierry, J.C. (1996). The crystal structure of human cyclin H. *FEBS Lett* **397**, 65-69.
- 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.
- Asturias, F.J., and Kornberg, R.D. (1999). Protein crystallization on lipid layers and structure determination of the RNA polymerase II transcription initiation complex. *J Biol Chem* **274**, 6813-6816.
- 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.
- 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., Lenasi, T., Chen, H., Johansen, E.B., Guo, S., and Peterlin, B.M. (2009). 7SK snRNP/P-TEFb couples transcription elongation with alternative splicing and is essential for vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7798-7803.
- 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.

- Bartkowiak, B., Liu, P.D., Phatnani, H.P., Fuda, N.J., Cooper, J.J., Price, D.H., Adelman, K., Lis, J.T., and Greenleaf, A.L. (2010). CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Gene Dev* 24, 2303-2316.
- Baumli, S., Endicott, J.A., and Johnson, L.N. (2010). Halogen bonds form the basis for selective P-TEFb inhibition by DRB. *Chem Biol* 17, 931-936.
- 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 Maraia, R.J. (2010). Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta* 1799, 365-378.
- Belanger, F., Baigude, H., and Rana, T.M. (2009). U30 of 7SK RNA forms a specific photo-cross-link with Hexim1 in the context of both a minimal RNA-binding site and a fully reconstituted 7SK/Hexim1/P-TEFb ribonucleoprotein complex. *J Mol Biol* 386, 1094-1107.
- Bhattacharya, R., Perumal, K., Sinha, K., Maraia, R., and Reddy, R. (2002). Methylphosphate cap structure in small RNAs reduces the affinity of RNAs to La protein. *Gene Expr* 10, 243-253.
- Bigalke, J.M., Czudnochowski, N., Vollmuth, F., Vogel-Bachmayr, K., Anand, K., and Geyer, M. (2011). Formation of Tat-TAR containing ribonucleoprotein complexes for biochemical and structural analyses. *Methods* 53, 78-84.
- 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.
- Boulanger, M.C., Liang, C., Russell, R.S., Lin, R., Bedford, M.T., Wainberg, M.A., and Richard, S. (2005). Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol* 79, 124-131.
- Bousquet-Antonelli, C., and Deragon, J.M. (2009). A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA* 15, 750-764.
- 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.
- Bres, V., Kiernan, R.E., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Treand, C., Emiliani, S., Peloponese, J.M., Jeang, K.T., Coux, O., *et al.* (2003). A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol* 5, 754-761.
- Brickey, W.J., and Greenleaf, A.L. (1995). Functional-Studies of the Carboxy-Terminal Repeat Domain of *Drosophila* Rna-Polymerase-II in-Vivo. *Genetics* 140, 599-613.
- Brow, D.A., and Guthrie, C. (1988). Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature* 334, 213-218.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA Polymerase II CTD Cycle. *Mol Cell* 36, 541-546.
- Chambers, J.C., Kurilla, M.G., and Keene, J.D. (1983). Association between the 7 S RNA and the lupus La protein varies among cell types. *J Biol Chem* 258, 11438-11441.
- Chao, S.H., Fujinaga, K., Marion, J.E., Taube, R., Sausville, E.A., Senderowicz, A.M., Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2000). Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem* 275, 28345-28348.

- Chapman, R.D., Haidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase IICTD. *Trends Genet* 24, 289-296.
- 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.
- Chen, H.T., and Hahn, S. (2004). Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell* 119, 169-180.
- 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.
- Chen, Y., Yamaguchi, Y., Tsugeno, Y., Yamamoto, J., Yamada, T., Nakamura, M., Hisatake, K., and Handa, H. (2009). DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have nonredundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation. *Genes Dev* 23, 2765-2777.
- Chen, Y.W. (2001). Solution solution: using NMR models for molecular replacement. *Acta Crystallogr D* 57, 1457-1461.
- Chiba, K., Yamamoto, J., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2010). Promoter-proximal pausing and its release: Molecular mechanisms and physiological functions. *Exp Cell Res* 316, 2723-2730.
- Cho, S., Schroeder, S., Kaehlcke, 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.
- Choo, S., Schroeder, S., and Ott, M. (2010). CYCLING through transcription: posttranslational modifications of P-TEFb regulate transcription elongation. *Cell Cycle* 9, 1697-1705.
- Clery, A., Blatter, M., and Allain, F.H. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* 18, 290-298.
- Coin, F., and Egly, J.-M. (1998). Ten Years of TFIID. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 105-110.
- Coin, F., Egly, J.M., Renaud, J.P., and Moras, D. (1998). Damaged DNA is a decoy for the basal transcription factor TBP/TFIID. *M S-Med Sci* 14, 93-96.
- Cojocaru, M., Bouchard, A., Cloutier, P., Cooper, J.J., Varzavand, K., Price, D.H., and Coulombe, B. (2011). Transcription Factor IIS Cooperates with the E3 Ligase UBR5 to Ubiquitinate the CDK9 Subunit of the Positive Transcription Elongation Factor B. *J Biol Chem* 286, 5012-5022.
- Col, E., Caron, C., Seigneurin-Berny, D., Gracia, J., Favier, A., and Khochbin, S. (2001). The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J Biol Chem* 276, 28179-28184.
- ColdSpringHarbProtoc (2006). Measuring Protein Concentration in the Presence of Nucleic Acids by A280/A260: The Method of Warburg and Christian. *Cold Spring Harb Protoc*.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., and Lis, J.T. (2008). Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science* 322, 1845-1848.

Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev* 14, 218-226.

Cullen, B.R. (1994). RNA-sequence-mediated gene regulation in HIV-1. *Infect Agents Dis* 3, 68-76.

Czudnochowski, N. (2009). Biochemische Untersuchungen zur Regulation der Transkriptionselongation durch Hexim und 7SK snRNA (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.

D'Orso, I., and Frankel, A.D. (2009). Tat acetylation modulates assembly of a viral-host RNA-protein transcription complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3101-3106.

D'Orso, I., and Frankel, A.D. (2010). RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 815-821.

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 Falco, G., and Giordano, A. (1998). CDK9 (PITALRE): a multifunctional cdc2-related kinase. *J Cell Physiol* 177, 501-506.

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.

Diribarne, G., and Bensaude, O. (2009). 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biol* 6, 122-128.

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.

Durney, M.A., and D'Souza, V.M. (2010). Preformed protein-binding motifs in 7SK snRNA: structural and thermodynamic comparisons with retroviral TAR. *J Mol Biol* 404, 555-567.

Dvir, A. (2002). Promoter escape by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* 1577, 208-223.

Echalier, A., Endicott, J.A., and Noble, M.E. (2010). Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim Biophys Acta* 1804, 511-519.

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., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501.
- Feig, A.L. (2007). Applications of isothermal titration calorimetry in RNA biochemistry and biophysics. *Biopolymers* 87, 293-301.
- Fisher, H.F., and Singh, N. (1995). Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol* 259, 194-221.
- Franke, D., and Svergun, D.I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* 42, 342-346.
- Fu, J., Yoon, H.G., Qin, J., and Wong, J. (2007). Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. *Mol Cell Biol* 27, 4641-4651.
- 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.
- Garber, M.E., Wei, P., KewalRamani, V.N., Mayall, T.P., Herrmann, C.H., Rice, A.P., Littman, D.R., and Jones, K.A. (1998). The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Gene Dev* 12, 3512-3527.
- 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.
- Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J., and Bentley, D.L. (2008). RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nat Struct Mol Biol* 15, 71-78.
- 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.
- Haaland, R.E., Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (2005). siRNA depletion of 7SK snRNA induces apoptosis but does not affect expression of the HIV-1 LTR or P-TEFb-dependent cellular genes. *J Cell Physiol* 205, 463-470.
- Hahn, S. (2004). Structure of the RNA polymerase II transcription preinitiation complex and identification of transcription activator targets within the transcription machinery. *Faseb J* 18, C223-C223.
- 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., Liu, M., Hsu, J., Xue, Y., Chou, S., Burlingame, A., Krogan, N.J., Alber, T., and Zhou, Q. (2010). HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Mol Cell* 38, 428-438.
- He, N., and Zhou, Q. (2011). New Insights into the Control of HIV-1 Transcription: When Tat Meets the 7SK snRNP and Super Elongation Complex (SEC). *J Neuroimmune Pharmacol* *ahead of print*.

- 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.
- Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). Structure of the mediator subunit cyclin C and its implications for CDK8 function. *J Mol Biol* 350, 833-842.
- Honda, R., Lowe, E.D., Dubinina, E., Skamnaki, V., Cook, A., Brown, N.R., and Johnson, L.N. (2005). The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO J* 24, 452-463.
- 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.
- Ivanov, D., Kwak, Y.T., Guo, J., and Gaynor, R.B. (2000). Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties. *Mol Cell Biol* 20, 2970-2983.
- 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.
- Jelesarov, I., and Bosshard, H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit* 12, 3-18.
- 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.
- Jones, K.A., and Peterlin, B.M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* 63, 717-743.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* 26, 795-800.
- 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.
- Kantardjieff, K.A., and Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science* 12, 1865-1871.
- Karn, J. (1999). Tackling Tat. *J Mol Biol* 293, 235-254.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M.M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., *et al.* (2008). GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat Methods* 5, 53-55.
- Kenan, D.J., and Keene, J.D. (2004). La gets its wings. *Nat Struct Mol Biol* 11, 303-305.
- Kiernan, R.E., Emiliani, S., Nakayama, K., Castro, A., Labbe, J.C., Lorca, T., Nakayama Ki, K., and Benkirane, M. (2001). Interaction between cyclin T1 and SCF(SKP2) targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* 21, 7956-7970.

- 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, J.B., and Sharp, P.A. (2001). Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J Biol Chem* 276, 12317-12323.
- Kim, M., Suh, H., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2009). Phosphorylation of the Yeast Rpb1 C-terminal Domain at Serines 2, 5, and 7. *J Biol Chem* 284, 26421-26426.
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., and Kirschner, M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1659.
- Koch, M.H., Vachette, P., and Svergun, D.I. (2003). Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* 36, 147-227.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Gene Dev* 14, 2452-2460.
- Kostrewa, D., Zeller, M.E., Armache, K.J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., and Cramer, P. (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 462, 323-330.
- 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.
- 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.
- Krueger, B.J., Varzavand, K., Cooper, J.J., and Price, D.H. (2010). The mechanism of release of P-TEFb and HEXIM1 from the 7SK snRNP by viral and cellular activators includes a conformational change in 7SK. *PLoS One* 5, e12335.
- Kuehner, J.N., Pearson, E.L., and Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Bio* 12, 283-294.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lebars, I., Martinez-Zapien, D., Durand, A., Coutant, J., Kieffer, B., and Dock-Bregeon, A.C. (2010). HEXIM1 targets a repeated GAUC motif in the riboregulator of transcription 7SK and promotes base pair rearrangements. *Nucleic Acids Res* 38, 7749-7763.
- Lee, C.Y., Li, X.Y., Hechmer, A., Eisen, M., Biggin, M.D., Venters, B.J., Jiang, C.Z., Li, J., Pugh, B.F., and Gilmour, D.S. (2008). NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 28, 3290-3300.
- Lerner, M.G., and Carlson, H.A. (2006). APBS plugin for PyMOL. University of Michigan, Ann Arbor.
- Li, L., and Ismagilov, R.F. (2010). Protein Crystallization Using Microfluidic Technologies Based on Valves, Droplets and SlipChip. *Annu Rev Biophys*, Vol 39 39, 139-158.

Li, Q., Cooper, J.J., Altwerger, G.H., Feldkamp, M.D., Shea, M.A., and Price, D.H. (2007). HEXIM1 is a promiscuous double-stranded RNA-binding protein and interacts with RNAs in addition to 7SK in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 35, 2503-2512.

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, C., Smith, E.R., Takahashi, H., Lai, K.C., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., and Shilatifard, A. (2010). AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell* 37, 429-437.

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.

Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 18, 211-212.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., and Darnell, J.E. (2003). *Molecular Cell Biology*, 5th edn (New York, W.H. Freeman & Co Ltd).

Luo, W., and Bentley, D. (2004). A ribonucleolytic rat torpedo RNA polymerase II. *Cell* 119, 911-914.

Lupas, A.N., and Gruber, M. (2005). The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem* 70, 37-78.

Mandal, S.S., Chu, C., Wada, T., Handa, H., Shatkin, A.J., and Reinberg, D. (2004). Functional interactions of RNA-capping enzyme with factors that positively and negatively regulate promoter escape by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7572-7577.

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.

Marshall, N.F., and Price, D.H. (1992). Control of Formation of 2 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.

Mason, J.M., and Arndt, K.M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* 5, 170-176.

McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., and Bentley, D.L. (1997a). 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.

McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., and Bentley, D.L. (1997b). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.

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., and Bensaude, O. (2008). RNA-driven cyclin-dependent kinase regulation: when CDK9/cyclin T subunits of P-TEFb meet their ribonucleoprotein partners. *Biotechnol J* 3, 1022-1032.

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.

Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.

Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.

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.

Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M.P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J.L., *et al.* (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 110, 4445-4454.

Mueller, D., Garcia-Cuellar, M.P., Bach, C., Buhl, S., Maethner, E., and Slany, R.K. (2009). Misguided transcriptional elongation causes mixed lineage leukemia. *PLoS Biol* 7, e1000249.

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.

Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., and Adelman, K. (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* 39, 1507-1511.

Nechaev, S., and Adelman, K. (2011). Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta* 1809, 34-45.

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.

Ni, Z., Schwartz, B.E., Werner, J., Suarez, J.R., and Lis, J.T. (2004). Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* 13, 55-65.

Niesen, F.H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2, 2212-2221.

O'Keefe, B., Fong, Y., Chen, D., Zhou, S., and Zhou, Q. (2000). Requirement for a kinase-specific chaperone pathway in the production of a Cdk9/cyclin T1 heterodimer responsible for P-TEFb-mediated tat stimulation of HIV-1 transcription. *J Biol Chem* 275, 279-287.

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.

Ouchida, R., Kusuhara, M., Shimizu, N., Hisada, T., Makino, Y., Morimoto, C., Handa, H., Ohsuzu, F., and Tanaka, H. (2003). Suppression of NF-kappaB-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells. *Genes Cells* 8, 95-107.

- Pagans, S., Kauder, S.E., Kaehlcke, K., Sakane, N., Schroeder, S., Dormeyer, W., Triebel, R.C., Verdin, E., Schnolzer, M., and Ott, M. (2010). The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription. *Cell Host Microbe* 7, 234-244.
- Pagans, S., Pedal, A., North, B.J., Kaehlcke, K., Marshall, B.L., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Henklein, P., Frye, R., McBurney, M.W., *et al.* (2005). SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *Plos Biol* 3, 210-220.
- Pal, M., Ponticelli, A.S., and Luse, D.S. (2005). The role of the transcription bubble and TFIIB in promoter clearance by RNA polymerase II. *Mol Cell* 19, 101-110.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821-828.
- 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.
- Prelich, G. (2002). RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: Emerging clues to their function. *Eukaryot Cell* 1, 153-162.
- Price, D.H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 20, 2629-2634.
- Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., and Tainer, J.A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* 40, 191-285.
- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc Regulates Transcriptional Pause Release. *Cell* 141, 432-445.
- Ramakrishnan, R., Dow, E.C., and Rice, A.P. (2009). Characterization of Cdk9 T-loop phosphorylation in resting and activated CD4(+) T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 86, 1345-1350.
- Rasmussen, E.B., and Lis, J.T. (1993). In-Vivo Transcriptional Pausing and Cap Formation on 3 Drosophila Heat-Shock Genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7923-7927.
- Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532-537.
- Roessle, M.W., Klaering, R., Ristau, U., Robrahn, B., Jahn, D., Gehrman T., Konarev P., Round, A., Fiedler S., Hermesea, C., and Svergun, D. (2007). Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J Appl Cryst* 40, 190-194.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5, 725-738.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1996a). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.

- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996b). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* 3, 696-700.
- Sabo, A., Lusic, M., Cereseto, A., and Giacca, M. (2008). Acetylation of conserved lysines in the catalytic core of cyclin-dependent kinase 9 inhibits kinase activity and regulates transcription. *Mol Cell Biol* 28, 2201-2212.
- 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.
- Sano, M., Abdellatif, M., Oh, H., Xie, M., Bagella, L., Giordano, A., Michael, L.H., DeMayo, F.J., and Schneider, M.D. (2002). Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat Med* 8, 1310-1317.
- Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 557-567.
- Schneider, T.R., and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1772-1779.
- 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* 49, 3083-3091.
- 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.
- Sedore, S.C., Byers, S.A., Biglione, S., Price, J.P., Maury, W.J., and Price, D.H. (2007). Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. *Nucleic Acids Res* 35, 4347-4358.
- Shimizu, N., Ouchida, R., Yoshikawa, N., Hisada, T., Watanabe, H., Okamoto, K., Kusuhara, M., Handa, H., Morimoto, C., and Tanaka, H. (2005). HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8555-8560.
- Shumyatsky, G., Wright, D., and Reddy, R. (1993) Methylphosphate cap structure increases the stability of 7SK, B2 and U6 small RNAs in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res* 21, 4756-4761.
- Slany, R.K. (2009). The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematol-Hematol J* 94, 984-993.
- Sobhian, B., Laguette, N., Yatim, A., Nakamura, M., Levy, Y., Kiernan, R., and Benkirane, M. (2010). HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Mol Cell* 38, 439-451.
- Stark, H., Fischer, N., Konevega, A.L., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2010). Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. *Nature* 466, 329-333.
- Strelkov, S.V., and Burkhard, P. (2002). Analysis of alpha-helical coiled coils with the program TWISTER reveals a structural mechanism for stutter compensation. *J Struct Biol* 137, 54-64.
- 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 USA* 94, 6075-6078.
- Sydow, J.F., Brueckner, F., Cheung, A.C.M., Damsma, G.E., Dengl, S., Lehmann, E., Vassylyev, D., and Cramer, P. (2009). Structural Basis of Transcription: Mismatch-Specific Fidelity Mechanisms and Paused RNA Polymerase II with Frayed RNA. *Mol Cell* 34, 710-721.

- Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C., and Price, D.H. (2010). Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* **465**, 747-751.
- Tao, J., and Frankel, A.D. (1992). Specific binding of arginine to TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2723-2726.
- Taylor, G.L. (2010). Introduction to phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 325-338.
- 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.
- Van Duyne, R., Easley, R., Wu, W., Berro, R., Pedati, C., Klase, Z., Kehn-Hall, K., Flynn, E.K., Symer, D.E., and Kashanchi, F. (2008). Lysine methylation of HIV-1 Tat regulates transcriptional activity of the viral LTR. *Retrovirology* **5**, 40-52.
- 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.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., and Mccawley, P. (1977). Establishment of 2 Cell Lines from Insect Spodoptera-Frugiperda (Lepidoptera-Noctuidae). *In Vitro Cell Dev B* **13**, 213-217.
- Villard, J. (2004). Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly* **134**, 571-579.
- Vollmuth, F. (2010). Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Regulation des Transkriptionsfaktors P-TEFb (Dortmund, TU Dortmund).
- 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.
- Vollmuth, F., and Geyer, M. (2010). Interaction of propionylated and butyrylated histone H3 lysine marks with Brd4 bromodomains. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 6768-6772.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., and Handa, H. (1998). Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *EMBO J* **17**, 7395-7403.
- 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.
- Wen, Y., and Shatkin, A.J. (1999). Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev* **13**, 1774-1779.
- West, S., Gromak, N., and Proudfoot, N.J. (2004). Human 5' --> 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* **432**, 522-525.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668-673.

- Winkler, W., Nahvi, A., and Breaker, R.R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419, 952-956.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 179, 131-137.
- Wittmann, B.M., Fujinaga, K., Deng, H., Ogba, N., and Montano, M.M. (2005). The breast cell growth inhibitor, estrogen down regulated gene 1, modulates a novel functional interaction between estrogen receptor alpha and transcriptional elongation factor cyclin T1. *Oncogene* 24, 5576-5588.
- 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.
- 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.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41-51.
- 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.
- Yokoyama, A., Lin, M., Naresh, A., Kitabayashi, I., and Cleary, M.L. (2010). A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell* 17, 198-212.
- Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., Hong, J.W., Nechaev, S., Adelman, K., Levine, M., and Young, R.A. (2007). RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* 39, 1512-1516.
- 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, 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.

Literaturverzeichnis

Zhu, G., Fujii, K., Belkina, N., Liu, Y., James, M., Herrero, J., and Shaw, S. (2005). Exceptional disfavor for proline at the P + 1 position among AGC and CAMK kinases establishes reciprocal specificity between them and the proline-directed kinases. *J Biol Chem* 280, 10743-10748.

Zieve, G., and Penman, S. (1976). Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization. *Cell* 8, 19-31.

7. ANHANG

7.1 Übersicht über die verwendeten Protein- und RNA-Konstrukte

<u>Proteinkonstrukt</u>	<u>Vektor</u>	<u>Theoretische Masse</u>	<u>Tatsächliche Masse</u>
BCDIN3 (400-689)	pGEX-4T1 tev	33.373 Da	33.378 Da
Cdk9 (1-372)	(Czudnochowski, 2009)		
Cdk9 (1-340)	(Czudnochowski, 2009)		
Cdk9 (1-330)	(Baumli et al., 2009)		
Cyclin T1 (1-272)	(Czudnochowski, 2009)		
Cyclin T1 (1-259)	(Baumli et al., 2009)		
Cyclin T1:Tat (1-272:1-72)	(Bigalke et al., 2011)		
Hexim1 (1-359)	(Czudnochowski, 2009)		
Hexim1 (255-359)	(Schonichen et al., 2010)		
Hexim1 (255-359, Δ316-318)	(Schonichen et al., 2010)		
Hexim1 (194-316)	pGEX-4T1 tev	19.244 Da	19.245 Da
Hexim1 (194-359)	(Czudnochowski, 2009)		
Larp7 (24-555)	(Vollmuth, 2010)		
Larp7 (24-248)	pGEX-4T1 tev	26.209 Da	26.215 Da
Larp7 (24-288)	pGEX-4T1 tev	30.741 Da	30.746 Da
Larp7 (24-328)	pGEX-4T1 tev	35.180 Da	35.192 Da
Larp7 (339-555)	pGEX-4T1 tev	25.202 Da	25.206 Da
Larp7 (346-555)	pGEX-4T1 tev	24.413 Da	24.416 Da
Tat (1-72)	(Bigalke et al., 2011)		
Tat (1-86)	(Czudnochowski, 2009)		

EIAV TAR RNA (ITC-Messung):

5´-GCUCAGAUUCUGCGGUCUGAGCCUCAGAUUCUGCGGUCUGAG-3´

HIV-1 TAR RNA:

(Bigalke et al., 2011)

7.2 TWISTER-Analyse

Tabelle 3: Strukturelle Parameter der *coiled coil*-Segmente der Hexim1 TBD(wt) (blau) und der TBD(Δstammer) (grün). Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm TWISTER (Strelkov and Burkhard, 2002).

Bereich	<i>Coiled coil</i> Radius (Å)	<i>Coiled coil</i> Ganghöhe (Å)	Cricksche Phase (°)	Reste pro α-helikaler Umdrehung	Anstieg pro α-helikalem Rest (Å)
284-313	5,38 ± 0,41	100,9 ± 19,1	a: 19,44 ± 5,63 d: -36,06 ± 4,05	3,66 ± 0,09	1,46 ± 0,08
319-348	4,96 ± 0,63	154,7 ± 56,9	a: 24,28 ± 3,25 d: -32,57 ± 2,78	3,61 ± 0,09	1,43 ± 0,04
284-313	5,03 ± 0,21	140,5 ± 14,5	a: 13,00 ± 4,96 d: -37,15 ± 5,05	3,62 ± 0,05	1,47 ± 0,04
319-348	4,99 ± 0,20	127,2 ± 32,5	a: 22,38 ± 2,92 d: -33,58 ± 1,84	3,62 ± 0,05	1,44 ± 0,05
284-348	5,00 ± 0,21	134,0 ± 25,6	a: 17,17 ± 6,32 d: -35,33 ± 3,74	3,62 ± 0,05	1,46 ± 0,05

7.3 DLS des P-TEFb/Hexim1 (194-316) Komplexes

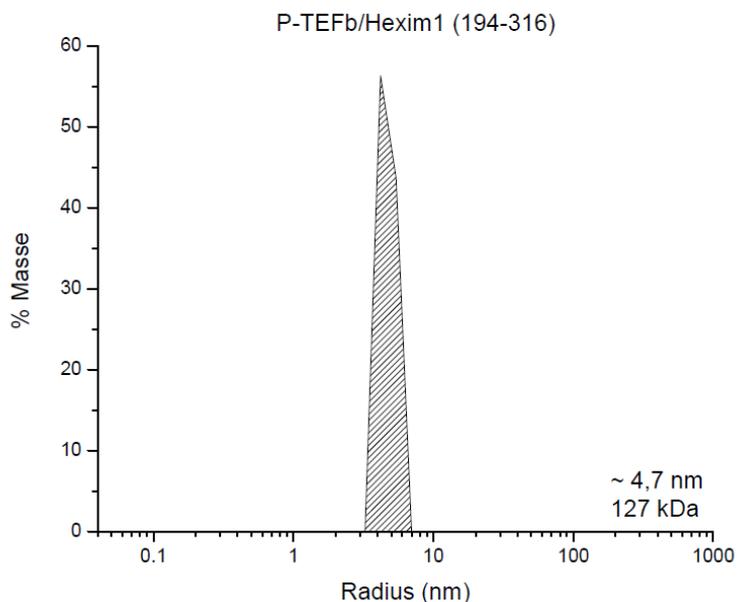


Abbildung 56: DLS-Messung von P-TEFb/Hexim1 (194-316). Die Probe ist monodispers und es konnte ein mittlerer Radius von 4,7 nm berechnet werden. Dies entspricht einem theoretischen Molekulargewicht von 127 kDa, wenn man von einem globulären Komplex ausgeht. Die Masse stimmt mit der berechneten und der per ESI-MS bestimmten Masse des Komplexes im Rahmen der Fehlergenauigkeit überein (82,3 kDa).

7.4 Substanzen der Thermofluor-Analyse

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffersubstanzen in der Thermofluor-Analyse.

#	Puffersubstanz (100 mM)	Schmelztemperatur T_m (K)
1	Bis Tris pH 5,6	322
2	Bis Tris pH 6,0	325
3	Bis Tris pH 6,4	326
4	Bis Tris pH 6,8	314
5	Bis Tris pH 7,2	326
6	Bis Tris pH 7,6	327
7	Bis Tris pH 8,0	322
8	Hepes pH 6,0	322
9	Hepes pH 6,4	321
10	Hepes pH 6,8	319
11	Hepes pH 7,2	327
12	Hepes pH 7,6	326
13	Hepes pH 8,0	324
14	Hepes pH 8,4	312
15	Hepes pH 8,8	326
16	Imidazol pH 5,4	322
17	Imidazol pH 5,8	324

18	Imidazol pH 6,2	326
19	Imidazol pH 6,6	325
20	Imidazol pH 7,0	326
21	Imidazol pH 7,4	320
22	Imidazol pH 7,8	324
23	Imidazol pH 8,2	323
24	MES pH 4,6	323
25	MES pH 5,0	315
26	MES pH 5,4	321
27	MES pH 5,8	324
28	MES pH 6,2	327
29	MES pH 6,6	327
30	MES pH 7,0	321
31	MES pH 7,4	325
32	K-/Natriumphosphat pH 5,8	324
33	K-/Natriumphosphat pH 6,2	322
34	K-/Natriumphosphat pH 6,6	318
35	K-/Natriumphosphat pH 7,0	325
36	K-/Natriumphosphat pH 7,4	311
37	K-/Natriumphosphat pH 8,2	327
38	K-/Natriumphosphat pH 8,6	318
39	Tris pH 6,6	324
40	Tris pH 7,0	325
41	Tris pH 7,4	313
42	Tris pH 7,8	323
43	Tris pH 8,2	325
44	Tris pH 8,6	320
45	Tris pH 9,0	319
46	Tris pH 9,4	318

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Zusätze in der Thermofluor-Analyse.

#	Zusatz	Konzentration	Schmelztemperatur T _m (K)
1	2,5-Hexandiol	4% (v/v)	321
2	Ammoniumsulfat	100 mM	324
3	ATP	10 mM	318
4	Bariumchlorid	10 mM	322
5	Betainhydrochlorid	10 mM	321
6	Calciumchlorid	10 mM	323
7	Cäsiumchlorid	100 mM	327
8	Dextransulfat	3% (w/v)	327
9	EDTA	10 mM	325
10	Ethylenglykol	3% (v/v)	323
11	Galactose	3% (w/v)	326
12	Glucose	3% (w/v)	330
13	Glycerol	3% (v/v)	328
14	Glycin	100 mM	328
15	Glycylglycylglycin	30 mM	318
16	GSH, GSSG	1 mM	323
17	Jeffamine M-600 pH 7,0	5% (v/v)	327
18	Kalium-/Natriumtartrat	100 mM	317
19	Kaliumchlorid	100 mM	324
20	Lithiumchlorid	100 mM	315
21	Magnesiumchlorid	10 mM	318
22	Manganchlorid	10 mM	318
23	MPD	3% (v/v)	320

Anhang

24	myo-Inositol	1,2% (w/v)	327
25	NADH	10 mM	318
26	Natriumbromid	10 mM	326
27	Natriumchlorid	200 mM	334
28	Natriumcitrat	100 mM	326
29	Natriumfluorid	50 mM	324
30	Natriumiodid	100 mM	320
31	Natriummalonat pH 7,0	100 mM	329
32	Natriumthiocyanat	200 mM	315
33	PEG 3.350	1% (w/v)	323
34	PEG 400	5% (v/v)	323
35	Pentaerythritolethoxylat	4% (v/v)	325
36	Proline	10 mM	325
37	Sarkosin	10 mM	316
38	Sorbitol	3% (w/v)	325
39	Spermidin	10 mM	317
40	Spermintetrahydrochlorid	10 mM	328
41	Strontiumchlorid	10 mM	326
42	Sucrose	3% (w/v)	324
43	Taurin	10 mM	323
44	TCEP hydrochlorid	10 mM	319
45	Trehalose	3% (w/v)	328
46	Trimethylamin N-Oxid	3% (w/v)	324
47	Xylitol	3% (w/v)	323

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bigalke
 Vorname: Janna Margareta
 Adresse: Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,
 Otto-Hahn-Str. 11, 44227 Dortmund
 Telefonnr.: 0231-1332307
 E-mail-Adresse: janna.bigalke@mpi-dortmund.mpg.de
 Nationalität: deutsch
 Geburtsdatum und –ort: 25.05.1983, Aachen
 Geschlecht: weiblich
 Familienstand: ledig

Promotion

Seit Januar 2008
 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung für physikalische Biochemie (Prof. Dr. R. Goody)
 Thema: Analyse der Regulation von P-TEFb durch Hexim1, 7SK snRNA und Larp7

Ausbildung

Aug. 1989 – Jun. 1993
 Osterfeldschule, Unna-Mühlhausen

Aug. 1993 – Jun. 2002
 Pestalozzi-Gymnasium Unna
 Abschluss: Abitur (1,7)

Okt. 2002 – Sep. 2005
 Bachelorstudium “Molecular Life Sciences” an der Universität zu Lübeck
 Abschluss: Bachelor of Science (1,8)

Mai 2005
 Forschungspraktikum: “Cloning, expression and purification of the NL63 coronavirus main proteinase” an der Tsinghua University, Laboratory of structural biology in Peking/China bei Prof. Dr. Z. Rao

Mär. 2005 – Jun. 2005
 Bachelorarbeit: “Structural and biochemical analysis of three viral 3C-like proteinases” an der Universität zu Lübeck, Institut für Biochemie bei Prof. Dr. R. Hilgenfeld

Okt. 2005 – Sep. 2007
 Masterstudium „Molecular Life Sciences“ an der Universität zu Lübeck
 Abschluss: Master of Science (1,5)

Sep. 2006 – Nov. 2006
 Forschungspraktikum: “Crystallization and binding studies with the first periplasmic domain of YidC and SecD” an der Simon Frasier University, Department

of Molecular Biology and Biochemistry bei Prof. Dr. M. Paetzel

Dez. 2006 – Feb. 2007

Forschungspraktikum: "Optimization of the cellular uptake of nucleic acids by non-covalently bound carrier peptides" an der Universität zu Lübeck, Institut für molekulare Medizin bei Prof. Dr. T. Restle

Mär. 2007 – Okt. 2007

Masterarbeit: "Biochemische und strukturelle Analysen zur Regulation des humanen Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb durch Hexim1" am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung für physikalische Biochemie bei P.D. Dr. M. Geyer

Zusätzliche berufliche Tätigkeiten

Apr. 2005 – Sep. 2005

Arbeit als studentische Hilfskraft bei Prof. Dr. R. Hilgenfeld, Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck: Organisation der Konferenz „Protein Crosslinking and Transglutanimases 8“ in Lübeck

Auslandserfahrungen

Aug. 1999 – Jul. 2000

J. L. Ilsley High School, Halifax/Kanada

Aug. 2004–Dez. 2004

University of New Mexico, Albuquerque/U.S.A.

Sprachkenntnisse

Englisch: 9 Jahre Schulausbildung, TOEFL Test (273)

Spanisch: 2 Jahre Schulausbildung, Juli – September 2002: Sprachkurs in Cuenca/Ecuador

Latein: 5 Jahre Schulausbildung (Latinum)

Veröffentlichungen

Bigalke JM, Dames SA, Blankenfeldt W, Grzesiek S, Geyer M
Structure and dynamics of a stabilized coiled coil domain in the P-TEFb regulator protein Hexim1 (in preparation)

Bigalke JM, Czudnochowski N, Vollmuth F, Vogel-Bachmayr K, Anand K, Geyer M
(2011) Formation of Tat-TAR containing ribonucleoprotein complexes for biochemical and structural analyses. *Methods* **53**: 78–84

Schönichen A, Bigalke JM, Urbanke C, Grzesiek S, Dames SA, Geyer M
(2010) A flexible bipartite coiled coil structure is required for the interaction of Hexim1 with the P-TEFB subunit cyclin T1. *Biochemistry* **49** (14): 3083-91

Tan J, Verschueren KH, Anand K, Shen J, Yang M, Xu Y, Rao Z, Bigalke J, Heisen B, Mesters JR, Chen K, Shen X, Jiang H, Hilgenfeld R

(2005) pH-dependent conformational flexibility of the SARS-CoV main proteinase (Mpro) dimer: Molecular dynamics simulations and multiple X-ray structure analyses. *Journal of Molecular Biology* **354** (1): 25-40

Danksagung

Mein Dank gilt:

PD Dr. Matthias Geyer für die Betreuung meiner Doktorarbeit, seine Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung.

Prof. Dr. Martin Engelhard für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

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

Prof. Dr. Roland Winter für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt für die Hilfe in kristallographischen Fragestellungen.

Dr. Ingrid Vetter und der Kristallographie-Gemeinschaft der Max-Planck-Institute in Dortmund und Heidelberg für die Aufnahme von Datensätzen am Synchrotron sowie die Organisation des Kristallisationslabors.

Prof. Dr. Holger Stark, David Haselbach, Prof. Dr. Dmitri Svergun, Dr. Weifeng Shang, Dr. Clement Blanchet und Dr. Kanchan Anand für freundschaftliche und fruchtbare Kooperationen.

Diana Ludwig für die Hilfe im Insektenzelllabor und ihre großartige Organisation unseres Labors.

Karin Vogel-Bachmayr für die Klonierung zahlreicher Konstrukte sowie die Produktion der RNAs.

Meiner Arbeitsgruppe André, Antje, Bernhard, Christian, Constanze, Florian H., Florian K., Friederike, Holger, Karl-Heinz, Nadine, Santiago, Sebastian, Sonja und Tim für zahlreiche Ratschläge und eine schöne Zeit in der AG Geyer.

Der Abteilung III für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Der Fakultät für Chemie für die Möglichkeit der Promotion an der TU Dortmund.

Meinen Freunden, meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir gegeben haben.

Stefan, der all meine Launen geduldig erträgt und ohne dessen Zuversicht und Energie ich diese Arbeit nicht fertiggestellt hätte.

Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, den 20. Juli 2011

Janna M. Bigalke