

Biochemische und strukturbiologische
Untersuchungen der Regulation
eukaryotischer Transkriptionselongation

Dissertation

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

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,
Abteilung Physikalische Biochemie, Dortmund

vorgelegt von
Dipl.-Biotechnologin
Antje Schulte
aus Unna

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2003 bis September 2006 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie (Prof. Dr. Roger S. Goody) unter der Leitung von Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, 20. November 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
	Regulation der Genexpression in Eukaryoten	
2.1	Die Transkriptionsregulation der Genexpression.....	3
2.2	RNA Polymerase II vermittelte Transkription.....	4
2.3	Der Transkriptionszyklus	6
2.4	Transkriptionsinitiation.....	6
2.5	Transkriptionselongation	6
2.5.1	Promotorfreilassung	7
2.5.2	Polymerase II Arrest.....	9
2.5.3	Faktoren, die den Transkriptionsarrest regulieren	9
2.5.4	Aufhebung des Arrests und Übergang in produktive Elongation	10
2.6	Die Familie der Cyclin abhängigen Kinasen und ihre regulierenden Cycline	11
2.6.1	Regulation Cyclin abhängiger Kinasen: Aktivierung und Inhibition.....	13
2.7	Der positive Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb	15
2.7.1	Identifikation und Charakterisierung von P-TEFb	15
2.8	Rekrutierung von P-TEFb.....	16
2.9	Kontrolle und Regulation von P-TEFb	18
2.9.1	Regulation der Transkriptionselongation durch 7SK snRNA und Hexim Proteine.....	18
2.9.2	Rolle von P-TEFb in HIV-1 Expression	20
2.9.3	Physiologische Bedeutung der P-TEFb Regulation.....	22
2.10	Zielsetzung.....	22
3	Material und Methoden	25
3.1	Materialien.....	25
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.2	Chromatographiesäulen und –materialien.....	25
3.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe.....	25
3.1.4	Reagenzienansätze.....	25
3.1.5	DNA-Konstrukte	26
3.1.6	Enzyme, Proteine und Antikörper	26
3.1.7	Geräte	27
3.1.8	Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie.....	27
3.1.9	Mikroorganismen und Zelllinien.....	28
3.2	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1	Gerichtete Mutagenese	28

3.2.2	Agarosegelelektrophorese	29
3.2.3	Restriktion von Plasmid-DNA	29
3.2.4	Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen	29
3.2.5	Ligation	30
3.2.6	Transformation von Bakterien	30
3.2.7	Isolierung der Plasmid-DNA	30
3.2.8	DNA-Sequenzierung	31
3.2.9	Glycerindauerkulturen	31
3.3	Proteinbiochemische Methoden	32
3.3.1	Proteinexpression und Zellernte.....	32
3.3.2	Zellaufschluss	32
3.3.3	Nickelaffinitätschromatographie	32
3.3.4	Glutathionaffinitätschromatographie.....	33
3.3.5	Präparative Größenausschlusschromatographie	33
3.3.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.3.8	Konzentrierung der Proteine	35
3.3.9	Klonierung und Reinigung der rekombinanten Proteine.....	35
3.3.10	GST-pulldown Experimente	36
3.3.11	Immundetektion von Proteinen (western blotting)	36
3.3.12	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit 1,5-IAEDANS	37
3.3.13	Elektrophoretischer Gelverschiebungstest (EMSA)	37
3.4	Biophysikalische Methoden.....	38
3.4.1	Gleichgewichts-Fluoreszenztitration.....	38
3.4.2	Transiente Fluoreszenzmessungen (stopped flow).....	38
3.4.3	Isothermale Titrationskalometrie	39
3.4.4	Massenspektrometrie	40
3.4.5	Analytische Größenausschlusschromatographie	40
3.5	Röntgenkristallographische Methoden	41
3.5.1	Proteinkristallisation	41
3.5.2	Datenaufnahme, Modellbau und Verfeinerung.....	42
4	Ergebnisse.....	43
	I. Untersuchungen zur Interaktion von Hexim1 und Cyclin T1	
4.1	Darstellung der Hexim1 Proteinkonstrukte.....	43
4.2	Identifizierung der Cyclin T1 Bindungsdomäne in Hexim1	45
4.3	Molekulare Dispersion des Hexim1/Cyclin T1 Komplexes	47
4.4	Charakterisierung der Interaktion zwischen Hexim1 und Cyclin T1	50
4.5	Kompetition der Bindung von Hexim1 und HIV-1 Tat an CycT1.....	53
4.6	Mutationsstudien zu Untersuchungen der Interaktionsfläche in Hexim1 und Cyclin T1	55
	II. Strukturuntersuchungen des CyclinT1/Tat/TAR Komplexes	

4.7	Darstellung des ternären Komplexes aus Cyclin T1, Tat und TAR RNA.....	61
4.7.1	Darstellung der Fusionskonstrukte aus Cyclin T1 und equine Tat	62
4.7.2	Synthese der EIAV TAR RNA und Kristallisation des CycT1/Tat/TAR Komplexes	63
4.7.3	Synthese und Charakterisierung verschiedener TAR RNA Konstrukte zur Veränderung der Kristallisationseigenschaften	64
4.8	Kristallstruktur der Cyclin-Boxen in Cyclin T1.....	67
4.8.1	Darstellung und Kristallisation der Cyclin T1 Proteinkonstrukte	67
4.8.2	Struktur der CycT1 Cyclin-Boxen	68
4.8.3	Implikationen des Tat-CycT1 Fusionsproteins für die Transaktivierung	72
III. Strukturelle Charakterisierung der N-terminalen Region des humanen Forminproteins FHOD1		
4.9	Regulation der Aktinnukleierung durch FHOD1	75
4.10	Darstellung und Kristallisation der N-terminalen FHOD1 Proteinkonstrukte.....	78
4.11	Kristallstruktur der N-terminalen Region in FHOD1.....	82
4.11.1	Struktur der FH3 Domäne (116-339).....	83
4.11.2	Struktur der N-terminalen Domäne (1-115)	90
5	Diskussion	99
5.1	Regulation und virale Aktivierung des P-TEFb Komplexes	99
5.2	Struktur der N-terminalen Domänen von FHOD1	106
6	Anhang.....	113
6.1	Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_d aus Gleichgewichts-Fluoreszenztitrationen.....	113
6.2	Analyse von Verdrängungstitrationen mit Scientist	114
7	Literaturverzeichnis	117

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
A_x	Absorption bei der Wellenlänge x
Brd 4	Bromodomänenprotein 4
CAK	Cdk aktivierende Kinase
Cdc42	Zellteilungszyklusprotein 42 (cell division cycle protein 42)
Cdk	Cyclin abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CHAPS	3-[N-(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
CTD	C-terminale Domäne
C-Terminus	Carboxyterminus der Proteinprimärsequenz
Cyc	Cyclin
CIITA	Klasse II Transaktivator
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DRB	5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazolribosid
DRF	Diaphonous-verwandtes Formin (diaphonous related formin)
DSIF	DRB-Sensitivität-induzierender Faktor
DTE	Dithioerythritol
EEC	früher Elongationskomplex (early elongation complex)
EMSA	Elektrophoretischer Gelverschiebungstest (electrophoretic mobility shift assay)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FH	Forminhomologie
FHOD1	Forminhomologie Domäne enthaltenes Protein 1 (formin homology domain containing Protein 1)
g	Gramm
GBD	GTPase-bindende Domäne
GDP	Guanosindiphosphat
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintri-phosphat
HA	Hämagluthinin

Hexim1	HMBA-induzierbares Protein 1
HMBA	Hexamethylen-Bisacrylamid
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IAEDANS	5-2-Iod-oacetylaminonaphtalene-1-Sulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
LB	Luria-Bertani
LMW	Marker für Moleküle mit kleinem Molekulargewicht (low molecular weight marker)
LTR	Lange terminale Wiederholung (long terminal repeat)
M	molar
MAD	multiwavelength anomalous diffraction
MALDI MS	Matrix-unterstützte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
mDia1	Diaphanous aus Säugetieren (mammalian Diaphanous 1)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Massenspektrometrie
NELF	negativer Elongationsfaktor
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-essigsäure
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
N-Terminus	Aminoterminus der Proteinprimärsequenz
nt	Nukleotid(e)
K_D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
kDa	Kilo Dalton
OD_x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Proteindatenbank
Pfam	Internetprogramm zur Analyse der Domänenarchitektur (protein families database)
PI-3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
P-TEFb	Positiver Transkriptionselongationsfaktor b
Rac	Ras verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat
Ras	Rattensarcoma
RBD	Ras-bindende Domäne
RMS	Wurzel des mittleren Abstandsquadrats (root mean square)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)

RNA Pol II	RNA Polymerase II
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SLS	Swiss Light Source (Synchrotron)
SMART	Internetprogramm zur Analyse der Domänenarchitektur (simple modular architecture research tool)
snRNA	kleine nukleare RNA (small nuclear RNA)
SRE	Element, das auf Serum reagiert (serum response element)
TBD	Cyclin T-bindende Domäne
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TOF	Flugzeit (time of flight)
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen

1 Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

2 Einleitung

Regulation der Genexpression in Eukaryoten

Die Regulation der Genexpression ist aufgrund ihrer fundamentalen Bedeutung für Zellwachstum, Entwicklung und Überleben eines Organismus ein intensiv untersuchtes Gebiet der Biowissenschaften. Die Entwicklung einer differentiellen Genexpression in multizellulären Organismen bildet die Grundlage der Zelltyp-Spezifität. Fehlregulationen im Muster der Genexpression haben schwerwiegende Effekte auf zelluläre Funktionen und sind häufig Ursachen verschiedener Stoffwechselkrankheiten. Von den vielen zellulären Prozessen, die die Genexpression kontrollieren können, stellt die Transkriptionsregulation einen direkten Mechanismus dar. Transkription eukaryotischer Gene ist ein komplexer Prozess, an dem neben der chromosomalen DNA eine Vielzahl von Proteinkomplexen beteiligt ist.

2.1 Die Transkriptionsregulation der Genexpression

Die Transkription wird durch die RNA Polymerase II (RNA Pol II) katalysiert, welche von jedem Gen, das für ein Protein kodiert, eine Boten RNA (messenger RNA, mRNA) synthetisiert. Das entstehende mRNA Transkript durchläuft verschiedene Prozessierungsstufen, bevor es als reife mRNA für fast alle Gene in ein Protein translatiert wird. Diese Reifung der RNA erfolgt hauptsächlich in drei Schritten, die als „Splicing“, „Capping“ und „Polyadenylierung“ bekannt sind. Alle diese Prozesse geschehen oft parallel zur Transkriptionsreaktion. Die RNA prozessierenden Proteinkomplexe sind daher sehr eng mit der Transkriptionsmaschinerie verbunden, im Speziellen interagieren sie mit den an der Elongation beteiligten Proteinen (Proudfoot et al., 2002).

In eukaryotischen Zellen ist die mRNA Transkription ein hochregulierter Prozess, der das Zusammenspiel von DNA, vielen Proteinfaktoren und dem RNA Transkript erforderlich macht (Naar et al., 2001). Als Antwort auf entsprechende Signale beeinflussen viele Faktoren die Fähigkeit der RNA Pol II, spezielle Gene zu erreichen, sie zu binden oder zu transkribieren. Eukaryotische DNA und Histone sind in einer hoch kondensierten Struktur, bekannt als Chromatin, gepackt und diese Chromatinstruktur nimmt ebenso dynamisch an der Transkriptionsregulation teil (Narlikar et al., 2002). Die DNA Elemente, die Transkription kontrollieren, sind in sogenannten Promotoren enthalten, an die transkriptionelle Aktivatoren und Inhibitoren binden können (Kadonaga, 2004), sowie generelle Transkriptionsfaktoren (TF's). Diese generellen TF's sind für die Transkription von allen Genen notwendig (Smale and Kadonaga, 2003). Ein unterschiedliches Set an Koregulatoren vermittelt Inhibition und Aktivierung, sie stellen oft Verbindungselemente zwischen Regulatoren und der generellen Transkriptionsmaschinerie dar (Naar et al., 2001). Alle diese Komponenten arbeiten zusammen und setzen die Transkriptionslevel für jedes einzelne Gen fest. So wird eine Vielfalt an Regulationsmöglichkeiten geboten, die die Bedeutung der Transkription für den Stoffwechsel der Zelle unterstreicht (Abb.1).

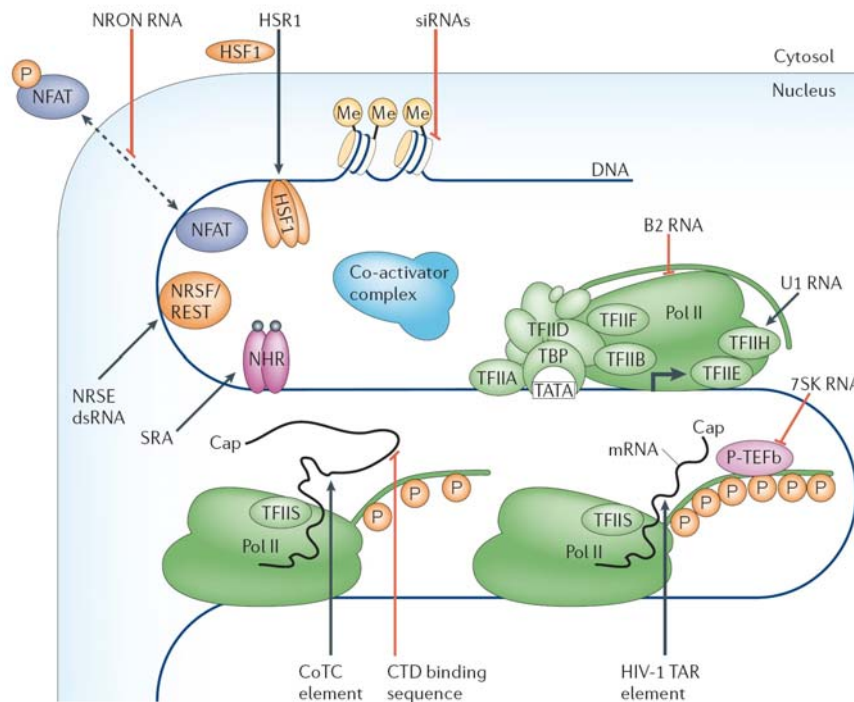


Abbildung 1: Eukaryotische Transkription ist ein komplexer Prozess, der an vielen Stellen reguliert wird. Dieses Schema illustriert, wie die Chromatin Struktur, viele regulatorische Proteine, die RNA Pol II und das mRNA Transkript zusammenarbeiten, um das Level der Expression eines bestimmten Gens festzulegen. Die Pol II Transkriptionsreaktion beinhaltet viele aufeinanderfolgende Schritte, wobei die Polymerase Bindung an den Promotor (dargestellt durch TATA), die Bewegung über die Transkriptionsstartseite hinaus und die darauffolgende Elongation hier dargestellt sind. Die Auswirkungen nicht kodierender RNA's werden durch Pfeile oder rote Balken als stimulierende bzw. inhibitorische Effekte gekennzeichnet. Entnommen aus Goodrich and Kugel, 2006; [co-transkriptionales „cleavage“ (CoTC), C-terminale Domäne (CTD), humanes Immundefizienzvirus-1 „transactivation response“ (HIV-1 TAR), Hitzeschockfaktorprotein 1 (HSF1), Hitzeschock RNA-1 (HSR1), Methylgruppe (Me), nuklearer Faktor von aktivierten T Zellen (NFAT), nuklearer Hormonrezeptor (NHR), nicht kodierender Repressor von NFAT (NRON), neuronrestriktive „Silencer“ Element Doppelstrang RNA (NRSE dsRNA), neuronrestriktiver silencing Faktor (RE-1-silencing NRSF), Phosphorylgruppe (P), positiver Transkriptionelongationsfaktor b (P-TEFb), kurze Interferenz RNA (siRNA), Steroidrezeptor RNA Aktivator (SRA), TATA Box (TATA), TATA Box Bindungsprotein (TBP)].

2.2 RNA Polymerase II vermittelte Transkription

Die ubiquitär vorkommende RNA Pol II transkribiert in Eukaryoten alle mRNA kodierenden Gene und einzelne Gene, die für strukturelle RNAs kodieren. Dabei bildet die RNA Pol II das Zentrum der Transkriptionsmaschinerie, dessen Komposition sich im Verlauf der Transkription immer wieder ändert. Die RNA Pol II besteht aus 12 Untereinheiten mit einer molekularen Masse von mehr als 0,5 MDa. RNA Polymerase II ist anders als andere RNA Polymerasen erheblichen Modifizierungen durch verschiedenste Enzyme unterlegen. Obwohl das enzymatische Zentrum in allen drei Säugetier-Polymerasen fast identisch ist, sind große Unterschiede in ihrer Oberfläche auszumachen, was sich in der Natur der C-terminalen Domäne (CTD) widerspiegelt, einer 378 Aminosäuren langen Domäne, die in keiner anderen Polymerase existiert.

Die Modifikationen der CTD verändern die Konformation und damit ihre Fähigkeit, mit Faktoren der Transkriptionselongation, der RNA Prozessierung und der Termination zu assoziieren, in beträchtlicher Weise. Diese Modifikationen sind bestimmend für die Koordination der Transkriptionsereignisse (Saunders et al., 2006). Jede Wiederholung besteht aus sieben Aminosäuren mit der Konsensussequenz YSPTSPS, wobei die Serine 2 und 5 phosphoryliert werden (Dahmus, 1995; Prelich, 2002). Die Anzahl der Wiederholungen, die exakt der Konsensussequenz entsprechen, variiert zwischen verschiedenen Spezies, was wiederum mit der Genomkomplexität korreliert. Im Unterschied zu den 52 Wiederholungen der humanen RNA Pol II besitzt die RNA Pol II aus Hefe nur 26 Wiederholungen. Die CTD kann durch Phosphorylierungen, Glykosylierungen oder cis/trans Isomerisierungen der Proline modifiziert werden (Meinhart et al., 2005). Mehrere Proteine regulieren den Phosphorylierungsgrad der CTD. Während des gesamten Transkriptionszyklus unterliegt die CTD einer ständigen Regulation durch Kinasen und entsprechenden Phosphatasen (siehe Abb. 1). Nach der Termination wird die RNA Pol II durch Phosphatasen dephosphoryliert und steht damit für neue Transkriptionsrunden zur Verfügung.

Ein wichtiges Charakteristikum während des Übergangs vom Initiations- zum Elongationskomplex ist der Wechsel von einer hypophosphorylierten zu einer hyperphosphorylierten Form der RNA Pol II (Sims et al., 2004). Phosphorylierungen finden vorherrschend an den Serinen an Positionen 2 und 5 statt. Cdk7 des TFIIF Komplexes und Cdk8 phosphorylieren vornehmlich an den Ser5, während Cdk9, als Bestandteil des positiven Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb (siehe Kapitel 2.6), hauptsächlich die Position Ser2 phosphoryliert. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Modifikationen der CTD dargestellt. Das Maß der Ser5 Phosphorylierung gipfelt früh im Transkriptionszyklus und bleibt konstant oder nimmt zum 3' Ende eines Gens hin ab. Im Gegensatz dazu dominiert die Ser2 Phosphorylierung im Verlauf und nimmt zum 3' Ende eines Gens zu. Somit geschieht diese Phosphorylierung parallel zur produktiven Elongation (Saunders et al., 2006).

Die Kristallstruktur der RNA Pol II eines Hefeorganismus und ihre Struktur im Komplex mit DNA wurden vor fünf Jahren im Labor von Roger Kornberg bestimmt (Cramer et al., 2001) (Gnatt et al., 2001). Die CTD ist in der Kristallstruktur nicht sichtbar, was dafür spricht, dass sie keine geordnete Struktur annimmt.

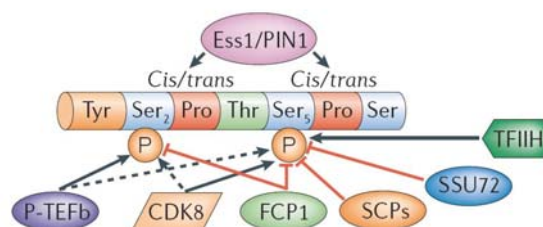


Abbildung 2: Die Modifikationen der C-terminalen Domäne der RNA Polymerase II. Die CTD der RNA Pol II besteht aus Tandem-Wiederholungssequenzen von Heptadpeptiden der Sequenz YSPTSPS. Diese Eigenschaft ist einzigartig für die RNA Pol II. Die CTD kann durch Phosphorylierungen, Glykosylierungen oder cis/trans Isomerisierungen der Proline modifiziert werden. Viele Proteine regulieren das Phosphorylierungsmuster der CTD während des gesamten Transkriptionszyklus (aus Saunders et al., 2006).

2.3 Der Transkriptionszyklus

Die Bildung von reifen mRNA Molekülen durch die RNA Pol II beinhaltet viele Prozesse, von denen einige in zeitlich geordneter Abfolge und andere parallel ablaufen. Die drei Hauptphasen des Transkriptionszyklus sind bekannt als Initiation, Elongation und Termination. Jeder einzelne Schritt ist einer spezifischen Regulation unterlegen. Während der Initiation bildet sich ein transkriptionskompetenter RNA Pol II Komplex am Promotor und richtet das DNA „Template“ im aktiven Zentrum der Polymerase aus. Das aktive Zentrum ist durch die Stelle definiert, in der während der Elongation Nukleotide mit dem Template gepaart und prozessiv verbunden werden, um RNA Transkripte zu produzieren. Die Elongation ist durch Synthese langer mRNA Transkripte definiert. Die Termination beinhaltet die Freisetzung des RNA Transkripts und die Dissoziation des Transkriptionskomplexes von der DNA.

2.4 Transkriptionsinitiation

Zu Beginn der Transkriptionsinitiation bildet sich ein Präinitiationskomplex (PIC) am Promotor, der aus RNA Pol II und einigen generellen TF's besteht. Die TF's positionieren die RNA Pol II in die Nähe des Transkriptionsstarts und diktieren die präzise Stelle der Transkriptionsinitiation. Dabei bilden die TF's enge Kontakte untereinander aus, sowie mit der Polymerase und einer extensiven Region der Promotor DNA. Die Stabilität, die durch diese vielfältigen Interaktionen generiert wird, präsentiert jedoch ein Hindernis für die RNA Pol II, eine Bewegung über den Promotor hinaus einzuleiten. Deshalb muß der PIC zuvor entmantelt werden. 11-15 DNA Basenpaare werden entwunden und formen den offenen Komplex, der dem Einzelstrang DNA Template erlaubt, an die aktive Stelle der RNA Pol II zu gelangen (Cramer, 2004; Hahn, 2004).

2.5 Transkriptionselongation

Bis vor kurzem zielte die Mehrzahl der Untersuchungen über molekulare Mechanismen der Transkription auf die Regulation der frühen Stadien, wie die Bildung des Initiationskomplexes und die Initiation. Neue Studien haben jedoch die bisher allgemein anerkannte Meinung, Transkription werde überwiegend auf der Stufe der RNA Pol II Rekrutierung zum Promotor reguliert, widerlegt. Kürzliche Ergebnisse über den Prozess der Elongation durch RNA Pol II (Saunders et al., 2006; Sims et al., 2004) haben diese Phase als einen dynamischen und hochregulierten Schritt im Transkriptionszyklus identifiziert. Eine Vielzahl von Faktoren wurde gefunden, die spezifisch die Elongation beeinflussen. Die RNA Pol II Transkriptionselongation wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben. Es wird erläutert, warum der Elongationsprozess zentral für die Integration und Koordination von vielen Ereignissen innerhalb der Transkription ist, die dann in der effizienten mRNA Produktion und dessen Export aus dem Zellkern resultieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich Proteine, die in der Transkriptionselongation eine Rolle spielen, untersucht.

Der Elongationsprozess ist in drei Stufen eingeteilt: die Promotorfreilassung, ein promotornaher Arrest und die produktive Elongation. Jeder dieser Schritte ist durch einen bemerkenswerten Unterschied in der Stabilität und im Verhalten des Transkriptionskomplexes aus RNA Pol II, DNA, RNA und Chromatin definiert, ebenso durch ein distinktes Repertoire an mit dem

Komplex assoziierten Faktoren. Im Folgenden werden die in Abb. 3 dargestellten Elongationsstufen, deren Regulation und ihre beteiligten Faktoren erläutert.

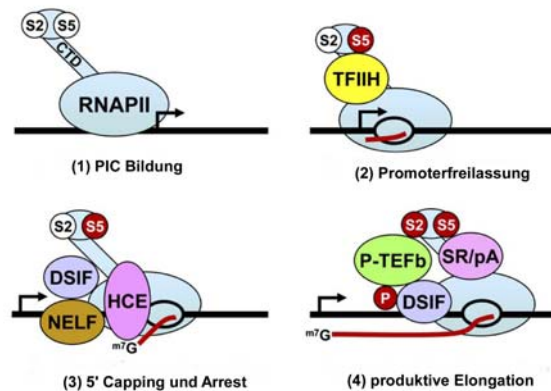


Abbildung 3: Der Transkriptionszyklus der eukaryotischen RNA Pol II. Vier Stufen der Transkription sind in dieser Abbildung hervorgehoben, deren charakteristische Ereignisse die folgenden sind: (1) Die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC). (2) Promotorlösung mit einhergehenden Ser5 Phosphorylierungen der CTD. (3) Rekrutierung der humanen Cappingenzyme (HCE), das 5' Capping des entstehenden RNA Transkripts und einhergehender Arrest der RNA Pol II. (4) Rekrutierung von P-TEFb mit Phosphorylierung der Ser2 der CTD und folgender produktiver Elongation und cotranslationalen Prozessierungsereignissen wie Splicing- (SP) und Polyadenylierungsmaschinerie (pA). Phosphorylierte Serine sind als rote Kreise dargestellt (nach Peterlin und Price, 2006).

2.5.1 Promotorfreilassung

Produktiv elongierende RNA Pol II kann Gene voller Länge in einer hochprozessiven Art transkribieren, ohne dabei vom DNA „Template“ zu dissoziieren oder das entstehende RNA Produkt freizulassen. Um jedoch diese Fähigkeiten zu erlangen, muß die RNA Pol II strukturelle und funktionelle Reifungen vollziehen. Promotorescape beschreibt den ersten Schritt in diesem Maturationsprozess, währenddessen die RNA Pol II ihre Kontakte zu Promotorsequenzelementen und zu einigen promotorgebundenen Faktoren abbricht. Parallel intensiviert die RNA Pol II die Bindung zum wachsenden RNA Transkript. Jeder dieser Schritte hängt von intrinsischen Interaktionen der RNA Pol II mit der entstehenden RNA und der Template DNA ab und ist einer Regulation durch extrinsische Faktoren unterlegen (Dvir, 2002). Promotorfreilassung ist dabei zumindest *in vitro* bei einigen Promotoren für die Transkriptionselongation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Saunders et al., 2006). Der Prozess beinhaltet die Übergänge, welche die RNA Pol II durchlaufen muß, um einen stabilen Elongationskomplex in eukaryotischer Transkription zu bilden. Dieser Prozess beinhaltet ATP abhängige strukturelle Umordnungen des Startkomplexes und konformationelle Änderungen der RNA Pol II. Der eigentliche Startkomplex nach erfolgter Initiation wird initial transkribierender Komplex (ITC) genannt. Die Promotorlösung ist erst vollendet, wenn die RNA stabil mit dem Transkriptionskomplex assoziiert. Der Transkriptionskomplex wird dann früher Elongationskomplex genannt (EEC), der zwar stabil ist, aber immer noch Eigenschaften aufweist, die ihn von einem voll funktionalen Elongationskomplex unterscheiden.

Das Entwinden der DNA zur Bildung der Transkriptionsblase beginnt an einer bestimmten Position, nämlich 20 Basenpaare abwärts von der Bindungsstelle für das TATA-Box-Bindeprotein (Pal et al., 2005). Hier durchläuft der ITC einige Zyklen von abortiver Initiation. Dabei werden kontinuierlich RNA Transkripte gebildet, diese dann aber entlassen und nicht mit der Template DNA assoziiert. Es entstehen so große Mengen an 2-3 Nukleotid langen RNA Fragmenten (Dvir, 2002). Nach Synthese des vierten Nukleotids wird das kurze RNA Stück durch die Schalterdomäne der RNA Pol II und durch den generellen TFIIB stabilisiert und somit die abortive Initiation reduziert. Nach der Synthese des fünften Nukleotids kollidiert das RNA Transkript mit TFIIB (Bushnell et al., 2004). Diese induzierte Spannung innerhalb des ITC führt zu schwacher DNA-RNA Interaktion am 3' Ende und somit zum Arrest der RNA Pol II. In einigen Fällen kann sogar Transkript „slippage“ eintreten. Dabei entpaart sich das entstehende RNA Transkript vom DNA Template und rehybridisiert aufwärts, so daß ein längeres RNA Transkript produziert wird. Diese Effekte tragen vermutlich dazu bei, daß die Promotorlösung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Hieb et al., 2006). An dieser Stelle kann der ITC die wachsende RNA noch verlassen. Diese Eigenschaften lassen erkennen, daß noch keine Umwandlung in einen stabilen Elongationskomplex stattgefunden hat. Die wachsende Transkriptionsblase induziert Stress, so daß diese daraufhin kollabiert und die so entstehende Energie zum Umbau des Transkriptionskomplexes genutzt werden kann (Pal et al., 2005). Das 8-9 Nukleotid lange RNA-DNA Hybrid geht Kontakte mit Proteinschleifen in der Nähe des RNA Ausgangstunnels ein, die den Komplex stabilisieren (Westover et al., 2004). Das verminderte Auftreten von abortiver Initiation (Holstege and Timmers, 1997), Transkript „slippage“ (Pal and Luse, 2003) ist ein Indikator für den Übergang des Transkriptionskomplexes in den frühen Elongationskomplex. Der EEC vollzieht kontinuierlich Anpassungen, bevor ein voll produktiv agierender Elongationskomplex entsteht. Obwohl die RNA stabil assoziiert, finden am EEC immer noch Transkript „slippage“ und „backtracking“ statt. Beim „backtracking“ bewegt sich der Komplex auf der DNA entlang, so dass ein Missalignment zwischen dem 3'-Ende der RNA mit der aktiven Stelle der RNA Pol II entsteht. Im Unterschied zum ITC ist der EEC allerdings resistent gegen Dissoziation von der RNA Pol II. Die Beziehung zwischen dem Abstand des EEC vom Transkriptionsstart und der Bildung eines reifen Elongationskomplexes ist bisher noch nicht verstanden, es wurde aber die Hypothese erstellt, daß die neu entstehende RNA mit der RNA Pol II interagiert und so selbst Elongationspotential bilden kann (Saunders et al., 2006). Eine Untereinheit der RNA Pol II, Rpb7, bindet die wachsende RNA am Ende des Ausgangstunnels mit seiner Oligonukleotidbindungsdomäne. Rpb7 ist in der Nähe der CTD zu finden. So wurde postuliert, Rpb7 dirigiere die RNA zur CTD und den dort wartenden RNA prozessierenden Enzymen. Parallel zu diesen Prozessen tritt oftmals ein transkriptioneller Arrest ein.

2.5.2 Polymerase II Arrest

Beim Transkriptionsarrest bleibt die RNA Pol II an der 5' Region der Transkriptionseinheit stehen, bis sie nach Stimulation entsprechender Signale effizient in die produktive Elongation übergehen kann. Der Übergang in den Arrestzustand ist durch die Kontrolle der RNA Pol II durch negative Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet. Dabei kann der Transkriptionskomplex nicht ohne Hilfe zusätzlicher Proteine entlang der DNA wandern. Die Vorwärtsbewegung der RNA Pol II wird zeitweise blockiert, wobei die RNA aber mit der aktiven Stelle angepasst bleibt. Dieser Arrest dient als eine Art Checkpoint vor dem Eintritt zur produktiven Elongation und bildet so einen bedeutenden Schritt in der Regulation der Elongation. Das hoch dynamische Niveau der Regulation ermöglicht eine schnelle Änderung des Transkriptionsergebnisses. Nach der Geninduktion stellt die Aufhebung des Arrests einen geschwindigkeitsbestimmenden und regulatorischen Schritt dar. Hitzeschock induzierbare Gene und die Säugetier-Proto-Onkogene *myc* und *fos* weisen eine RNA Pol II im Arrest auf (Rougvie and Lis, 1988). Transkriptional engagierte RNA Pol II befindet sich zumindest bei einer Untergruppe von Promotoren ebenfalls *in vivo* im Arrestzustand, was sowohl bei induzierbaren als auch bei sogenannten „Housekeeping“ Genen festgestellt wurde (Rougvie and Lis, 1990). Der Arrest stellt eine Kontrolle dar, ob RNA Pol II korrekt für die produktive Elongation vorbereitet ist (Kim et al., 2005). So findet zum Beispiel vor Aufhebung des Arrests das „Capping“ der mRNA statt, wodurch sich die RNA Stabilität erhöht.

2.5.3 Faktoren, die den Transkriptionsarrest regulieren

Die Behandlung von eukaryotischen Zellen mit dem Nukleotidanalogue 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) war seit vielen Jahren bekannt als Effektor für verkürzte Transkription (Sehgal et al., 1976), da DRB die Elongation, nicht aber die Initiation inhibiert. DRB agiert dabei als ein Kinaseinhibitor. Transkriptionsreaktionen, die mit Zellextrakt *in vitro* durchgeführt wurden, waren DRB-sensitiv (Chodosh et al., 1989). Andererseits verloren Transkriptionsansätze, die mit gereinigten Faktoren durchgeführt wurden, ihre DRB Sensitivität. In Versuchen, *in vitro* Transkription zu rekonstituieren, die die gleiche DRB Sensitivität aufweist wie *in vivo* (Price, 2000), wurden unabhängig voneinander zwei Faktoren gefunden: ein DRB-Sensitivität induzierender Faktor, genannt DSIF, und ein negativer Elongationsfaktor, NELF. DSIF und NELF kooperieren zur Inhibition der Transkriptionselongation und ihre negativen Effekte können durch ein drittes Protein, das durch DRB inhibiert wird, aufgehoben werden (Marshall and Price, 1995). Dieser Faktor, der als positiver Transkriptionselongationskomplex P-TEFb bezeichnet ist, wird in Kapitel 2.6 näher beschrieben. DSIF besteht aus zwei Elongationsfaktoren, Spt4 und Spt5, die von der Hefe bis zum humanen Organismus konserviert sind (Hartzog et al., 1998). NELF besteht aus vier Untereinheiten. DSIF bindet kurz nach der Initiation an die RNA Pol II, die zu diesem Zeitpunkt an den Ser5 phosphoryliert vorliegt. NELF interagiert mit DSIF und induziert so den Arrest der RNA Pol II (Wada et al., 1998). Die Position der RNA Pol II im Arrest korreliert mit der Position, an der NELF und DSIF ihre negativen Effekte ausüben, und ebenfalls mit der Position, an der die RNA aus der RNA Pol II herausragt (Palangat et al., 2005). Somit könnte ein Mechanismus, mit dem DSIF und NELF spezifisch den Arrest herbeiführen, durch RNA Interaktion induziert werden. Übereinstimmend mit diesem Modell wurde gefunden, dass eine NELF Untereinheit an RNA bindet (Fujinaga et al., 2004).

2.5.4 Aufhebung des Arrests und Übergang in produktive Elongation

Viele Faktoren sind notwendig für die Aufhebung des Arrests und ein Eintreten in die produktive Elongation, wonach die RNA Pol II vollständige, lange RNA Transkripte herstellt. Während dieses Übergangs werden die negativen Effekte von DSIF und NELF aufgehoben. So wird vermutet, dass die korrekte Modifizierung der RNA am 5'-Ende Voraussetzung für ein Ende des Arrests sein könnte (Pei et al., 2003). Zusätzlich stellt der Phosphorylierungszyklus der RNA Pol II hier eine wichtige Regulationsmöglichkeit dar. TFIIH vermittelte Phosphorylierung an Ser5 der CTD der RNA Pol II findet während der PIC Bildung statt und somit vor dem Erreichen des Arrestzustands der RNA Pol II. Durch Assoziation von NELF und DSIF mit dem Transkriptionskomplex wird der Arrest in der promotornahen Region induziert. P-TEFb vermittelte Phosphorylierung von Spt5, einer DSIF Untereinheit (Kim and Sharp, 2001), der NELF Untereinheit RD und den Ser2 der CTD stimuliert die produktive Elongation. P-TEFb überwindet so die Auswirkungen der negativen Faktoren und die RNA Pol II kann in die Phase der produktiven Elongation eintreten. Dieses Schlüsselereignis wird in Abb. 4 dargestellt. Ebenso hilft das „Capping“ Enzym, die negativen Effekte von DSIF und NELF aufzuheben (Mandal et al., 2004). Es assoziiert mit der Ser5-phosphorylierten CTD und mit der DSIF Untereinheit Spt5. Desweiteren spielt TFIIIS Aktivität eine Rolle bei der effizienten Aufhebung des Arrests. TFIIIS assoziiert ebenfalls mit der RNA Pol II im Arrestzustand (Adelman et al., 2005). Dieser generelle TF stimuliert die intrinsische RNA Spaltungsrate der RNA Pol II, um neue RNA 3' Enden nach „Backtracking“ Ereignissen in der aktiven Stelle der RNA Pol II zu generieren. Wenn der Übergang zum produktiven Komplex stattgefunden hat, dissoziiert NELF vom Komplex (Fujinaga et al., 2004). DSIF, TFIIIS und P-TEFb wandern mit der RNA Pol II entlang des Gens (Boehm et al., 2003). Phosphoryliertes DSIF bekommt eine positive Rolle in der Transkription nach der Aufhebung des Arrests (Yamada et al., 2006). Einige weitere Faktoren assoziieren ebenfalls mit dem Transkriptionskomplex. Darunter ist eine Klasse, die die Elongationsrate der RNA Pol II stimuliert, wie zum Beispiel TFIIIF, ELL und Elongin (Conaway and Conaway, 1999). Topoisomerasen sind vermutlich wichtig für die korrekte Elongation durch Regulation der Torsion auf der DNA, die während der Transkription erzeugt wird. Im gleichen Maß präsentieren Histone, die mit DNA Nukleosome bilden, eine Barriere für Transkription. Histonmodifikationen können die Elongation beeinflussen, wie zum Beispiel Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitylierung. Diese Modifikationen ändern den Zustand des Chromatins und ermöglichen wiederum anderen Faktoren, Chromatin zu manipulieren oder auch Faktoren zu bestimmten Genen zu rekrutieren (Saunders et al., 2006).

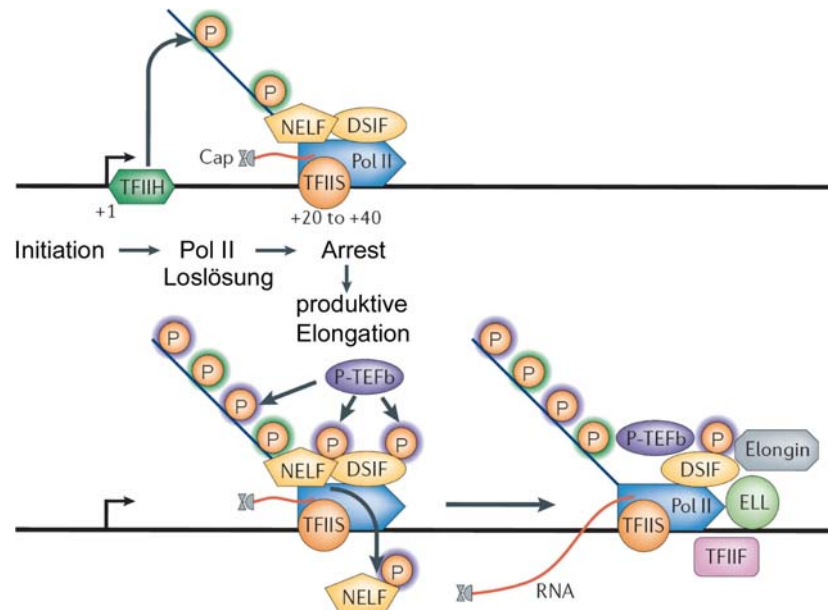


Abbildung 4: RNA Pol II Arrest und Übergang zu produktiver Elongation. TFIID vermittelte Ser5 Phosphorylierung der RNA Pol II geschieht bei der Bildung des Präinitiationskomplexes. Nach Bildung des frühen Elongationskomplexes gerät die RNA Pol II unter die Kontrolle von negativen Elongationsfaktoren, wie NELF und DSIF. Sie induzieren den Arrest der RNA Pol II und ermöglichen so das 5' Capping des RNA Transkripts. TFIIIS ermöglicht zusätzlich eine effiziente Loslösung vom Arrest durch neues Anpassen der zurückgefallenen Transkriptionskomplexe. P-TEFb vermittelte Phosphorylierung von NELF, DSIF und Ser2 der CTD stimulieren die produktive Elongation. DSIF, TFIIIS und P-TEFb begleiten die RNA Pol II während der mRNA Synthese entlang des Gens. Weitere Faktoren assoziieren zusätzlich mit dem Komplex und stimulieren ebenso die RNA Pol II Prozessivität (nach Saunders et al., 2006).

2.6 Die Familie der Cyclin abhängigen Kinasen und ihre regulierenden Cycline

Cdk's sind Schlüsselregulatoren einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Zellzyklusprogression, Transkription und neuronale Differenzierung. Die Kinaseaktivität der Cdk's ist deshalb streng reguliert. Cyclin abhängige Kinasen sind Ser/Thr Kinasen, die durch Assoziierung mit ihrer jeweiligen Cyclin Untereinheit aktiviert werden. Cycline sind nach ihrem charakteristischen Muster von Erscheinen und Verschwinden während des Zellzyklus benannt (Morgan, 1995). Bis heute wurden 13 Cdk's und 25 Cycline entdeckt (Knockaert et al., 2002). Zuerst wurden Cdk's aufgrund ihrer Zellzyklusfunktionen studiert. Geordnete Zellzyklusprogression wird durch Aktivierung und Deaktivierung der Cdk-Phosphorylierungen von verschiedenen Tumorsuppressorproteinen, Transkriptionsfaktoren, und vielen anderen Proteinen, die für DNA Replikation und Zellteilung wichtig sind, gesichert. Cdk's selbst sind streng reguliert durch Assoziierung mit Tumorsuppressorproteinen, durch subzelluläre Lokalisation oder durch posttranslationale Modifikationen.

Obwohl Cdk's initial wegen ihrer Zellzyklusfunktionen studiert wurden, ist mittlerweile gezeigt, dass einige Mitglieder in völlig unterschiedlichen biologischen Zusammenhängen eine Rolle spielen. Neben der Zellzykluskontrollfunktion sind sie essentiell in vielen anderen zellulären Prozessen, wie in der Transkriptionsregulation, Zelldifferenzierung, Zelltod und neuronalen

Prozessen. Eine Liste in Abb. 4 zeigt die bisher bekannten Cdk/Cyclin Paare und deren physiologische Rollen auf.

Drei Typen von Cdk/Cyclin Paaren regulieren RNA Pol II Transkription durch Phosphorylierung der CTD. Cdk7/Cyclin H ist Bestandteil des generellen Transkriptionsfaktors TFIID (Coin and Egly, 1998). Cdk9/Cyclin T bildet den P-TEFb Komplex. Das Cdk8/Cyclin C Paar interagiert mit MED12 und MED13, um eine tetramere Untereinheit des Mediator Komplexes zu bilden (Liao et al., 1995).

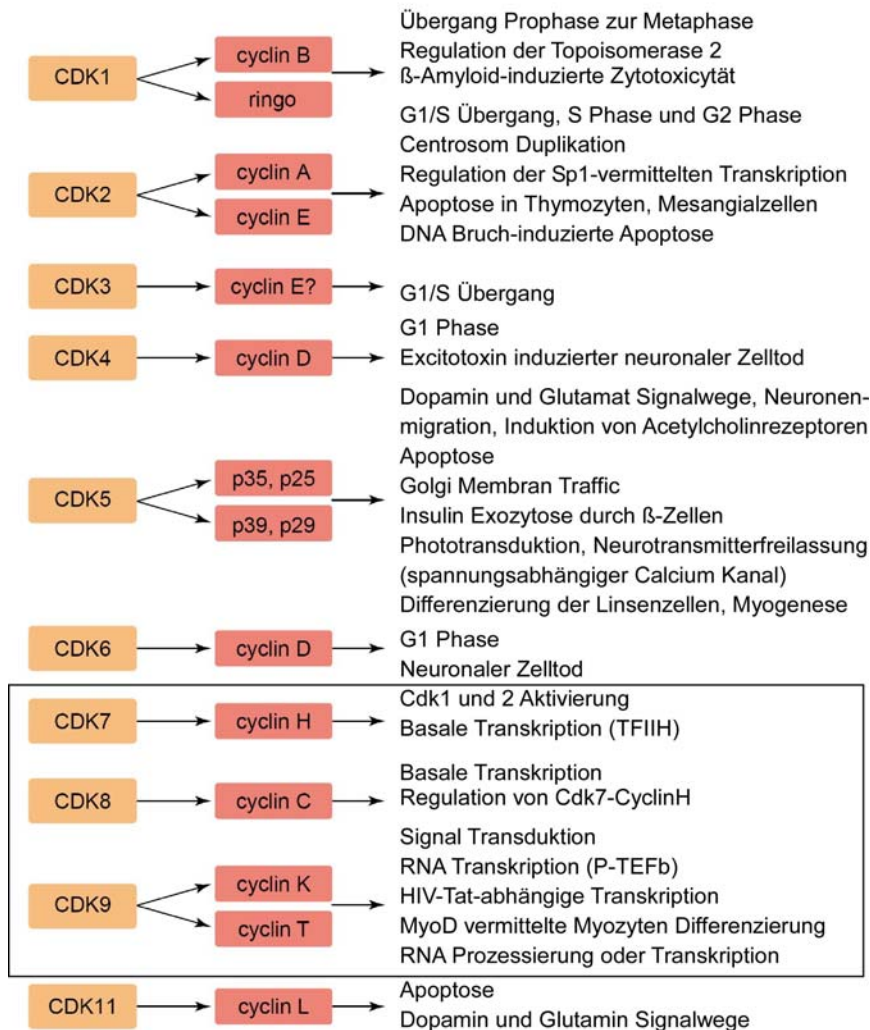


Abbildung 5: Funktionen der bisher bekannten humanen Cdk's und ihrer Cyclinpartner. 13 Cdk's und 25 Proteine mit Homologien in der Cyclinbox Faltung werden im humanen Genom kodiert. Hier sind nur die Cdk/Cyclin Paare gezeigt, von denen bekannt ist, dass sie einen Komplex bilden und deren unterschiedliche Funktionen angegeben sind, wobei die Cdk/Cyclin Paare, die in der Transkription eine Rolle spielen durch eine Box hervorgehoben sind (Knockaert et al., 2002).

Cycline besitzen N-terminal zwei charakteristische Cyclin-Boxen aus jeweils fünf α-Helices, über die sie mit den jeweiligen Cdk's assoziieren (Noble et al., 1997). Die Interaktion eines Cyclins mit der entsprechenden Kinase reguliert die Aktivierung der Kinase. Die N-terminale Cyclinbox, die initial

durch Sequenzanalyse identifiziert wurde, ist hoch konserviert zwischen den einzelnen Spezies (Andersen et al., 1997). Trotz großer Sequenzvariabilität in dem zweiten Cyclin-Boxrepeat 2 haben die bisher strukturell charakterisierten Cycline, Cyclin C (Hoepfner et al., 2005), Cyclin E (Honda et al., 2005), Cyclin A (Russo et al., 1996) und Cyclin H (Andersen et al., 1997) eine hohe strukturelle Homologie. Eine zweite interessante Eigenschaft der Cycline sind die Regionen außerhalb der Cyclinfaltung. Die meisten Cycline besitzen angrenzend an die Cyclinboxen spezifische N- und C-terminale Helices, die die Spezifität für Kinase und Substrat determinieren (Andersen et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur der N-terminalen Cyclin-Boxen in CycT1 mit kristallographischen Methoden in Zusammenarbeit mit Dr. Kanchan Anand am EMBL Heidelberg bestimmt.

2.6.1 Regulation Cyclin abhängiger Kinasen: Aktivierung und Inhibition

Cdks sind durch verschiedene Faktoren reguliert, zunächst jedoch durch ihre aktiverenden Cyclinpartner. Deren Konzentration ist einer strengen Expressionskontrolle unterlegen und der Abbau wird vielfach durch Ubiquitylierung reguliert (Morgan et al., 1995). Cdks selbst werden durch Phosphorylierung aktiviert oder inhibiert. Die meisten antiproliferativen Signale in der Zelle führen zur Induktion von Cdk Inhibitoren (Pavletich, 1999), wie zum Beispiel Faktoren aus der Cip oder INK4 Familie, die den Zellzyklus inhibieren. Die Kristallstrukturen des phosphorylierten Cdk2/CyclinA/p27^{Cip2} Inhibitor Komplexes (Russo et al., 1996) und des Cdk6/p16^{INK4a} Inhibitor Komplexes (Brotherton et al., 1998; Russo et al., 1998) bieten erste Einblicke in die Regulation der Kinaseaktivität. Mitglieder der Cip Familie binden und inhibieren den Cdk-Cyclin Komplex, wohingegen die INK4 Familie eine indirekte Strategie benutzt. Sie bindet die isolierte Kinase und verhindert Assoziation mit dem Cyclin (Sherr and Roberts, 1995). Die isolierte Cdk Untereinheit hat keine detektierbare Kinaseaktivität.

Aktivierung der Kinasen erfolgt in einem Zwei-Schritt Mechanismus (Abb. 6B). Der erste Schritt ist die Bindung an das entsprechende Cyclin, wodurch partielle Aktivität erlangt wird. Der zweite Schritt ist die Phosphorylierung an den Ser- und Thr-Resten der Kinase des Cdk/Cyclin Komplexes durch die Cdk-aktivierende Kinase (CAK) (Fischer and Morgan, 1994). Bisher sind die Kristallstrukturen von folgenden Kinasen bekannt: Cdk2 im Komplex mit Cyclin A (Russo et al., 1996), im Komplex mit Cyclin E (Honda et al., 2005), Cdk7 (Lolli et al., 2004) und Cdk6 (Russo et al., 1998). Exemplarisch ist die Struktur des Cdk2/Cyclin A Komplexes in Abb. 6A dargestellt. Cdk's besitzen einen N-terminalen Flügel, der reich an β -Faltblättern ist, und eine Haupthelix, die hochkonservierte PSTAIRE Helix, die in die Cyclin Bindung involviert ist. Diese Helix bildet zusammen mit einem größeren hauptsächlich α -helikalen C-terminalen Flügel das Aktivierungssegment, in dem sich auch das Threonin befindet, welches zur Aktivierung der Kinase phosphoryliert wird. In der Nähe dieses Segments befinden sich auch die katalytischen Reste, die diese Phosphorylierung induzieren. Assoziation mit einem Cyclin resultiert in einer Konformation der Kinase, in der die Substratstelle für ATP zugänglich wird. Die ATP Bindungsstelle ist zwischen den beiden Flügeln beherbergt und ATP Erkennung involviert Reste aus beiden Flügeln. Die Substratbindungsstelle ist mit dem C-terminalen Flügel assoziiert und die korrekte Orientierung des Aktivierungssegments ist notwendig für selektive Substraterkennung des Sequenzmotivs SPxK

(Brown et al., 1999; Cheng et al., 2006). Das Cyclin untergeht selbst keine starken Konformationsänderungen durch Bindung an die Kinase (Jeffrey et al., 1995). Volle Aktivierung wird dann durch Phosphorylierung eines Threonins in der Kinase erreicht. Die intrinsische strukturelle Flexibilität der Cdk's spielt eine zentrale Rolle, indem sie der Kinase erlaubt, auf vielen verschiedenen Wegen reguliert zu werden (Pavletich, 1999). Abbildung 6B fasst die hauptsächlich regulatorischen Prozesse zusammen, die allen Cdk's gemein sind. Die verschiedenen Regulationsprozesse spiegeln die unterschiedlichen Signalwege wider, in denen Cdk's eine Rolle spielen. Desweiteren gibt es eine intensive Forschung auf dem Gebiet der pharmakologischen Cdk Inhibitoren, denn Deregulation der Cdk's führt in vielen Fällen zu verschiedensten Krankheiten, wie Krebs, Diabetes und Entzündungsreaktionen (Noble et al., 2004). Viele der bisher bekannten „small molecule“ Inhibitoren binden in die ATP Bindungstasche des Kinase und andere zielen auf dessen inaktive Form, durch die bessere Selektivität erreicht werden kann.

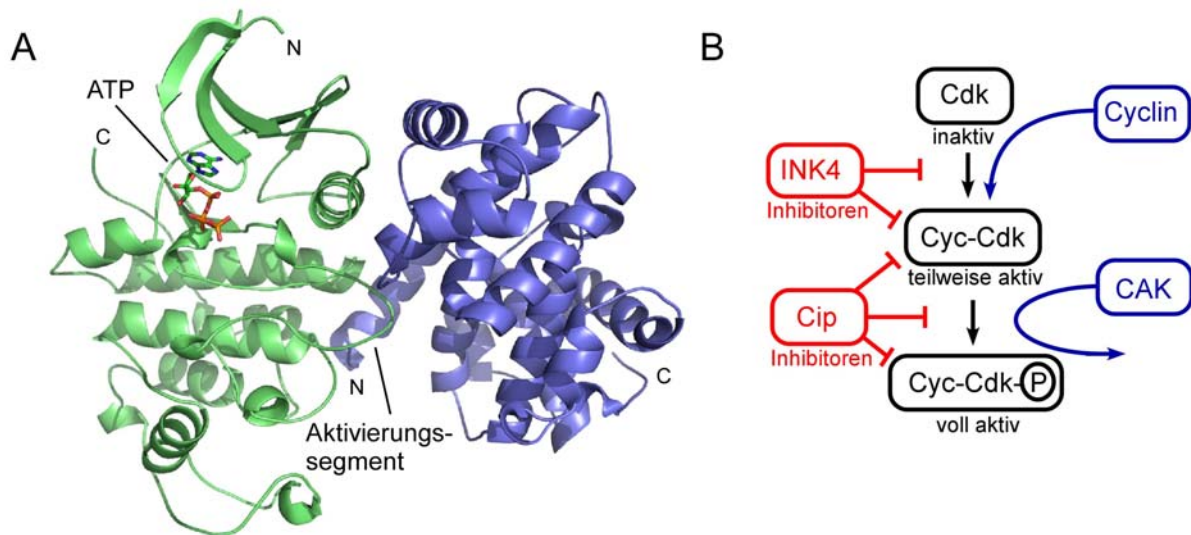


Abbildung 6: Struktur und Regulationsmechanismus der Cdk/Cyclin Paare. (A) Dargestellt ist die Komplexstruktur von Cyclin A (blau) und Cdk2 (grün), (Russo et al., 1996). (B) Cdk's werden auf molekularer Ebene durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Zur partiellen Aktivierung assoziiert die Kinase mit ihrem Cyclin und wird dann von einer Cyclin aktivierenden Kinase (CAK) durch Phosphorylierung aktiviert. P steht für die entstehende Phosphatgruppe. Zellzyklusinhibitoren greifen an verschiedenen Stellen in den Aktivierungsmechanismus der Cdk's ein.

Die Aufklärung der Kristallstruktur des Cdk2/Cyclin Komplexes mit einem Substratpeptid (Brown et al., 1999) gibt erste strukturelle Einblicke in die Substratspezifität der Cdk's. Über die Schlüsselereignisse in Substraterkennung und Spezifität der Cdk's ist bisher nur wenig bekannt. Die kanonische Sequenz in Substraten, die von Cdk's erkannt werden, ist S/TPxK/R, wobei S das zu phosphorylierende Serin ist. Substraterkennung kann in einigen Fällen auch durch eine Bindungsstelle auf dem Cyclin geleitet sein, die Substrate mit einem RxL Motiv auf dem ersten Repeat der Cyclin-Boxstruktur bindet (Cheng et al., 2006).

2.7 Der positive Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb

P-TEFb besteht aus der Cyclin abhängigen Kinase Cdk9 und ihrem Cyclinpartner Cyclin T. Der Komplex ist für die Produktion langer Transkripte *in vitro* notwendig (Barboric and Peterlin, 2005; Price, 2000). Der Arrest, der von negativen Elongationsfaktoren hervorgerufen wird, limitiert die RNA Pol II Prozessivität. P-TEFb kann diese negativen Effekte aufheben (Marshall and Price, 1995). Die Beobachtung, dass die Rekrutierung von P-TEFb zu Promotoren Genexpression aktiviert, macht seine Rolle im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Aufhebung des transkriptionellen Arrests klar (Lis et al., 2000). Die Inhibition von P-TEFb kann sogar zur allgemeinen Abnahme der RNA Pol II Dichte auf Genen führen. Für viele Gene allerdings sind die Defekte in Transkriptionselongation nicht offensichtlich. P-TEFb Inhibition führt zu falscher 3'-Prozessierung, was wiederum die wichtige Rolle der Ser2 Phosphorylierung in der Koordinierung der verschiedenen Abläufe widerspiegelt.

2.7.1 Identifikation und Charakterisierung von P-TEFb

Innerhalb der letzten Dekade wurde die Existenz und Identität von P-TEFb aufgeklärt. 1996 wurde gezeigt, dass P-TEFb die CTD der großen Untereinheit der RNA Pol II phosphoryliert (Marshall et al., 1996). Nachfolgende Klonierungsexperimente der zwei Untereinheiten von P-TEFb führten zur Identifizierung einer Cyclin abhängigen Kinase: Diese Kinase wurde wie viele andere Cyclin abhängigen Kinasen schon vorher in einem cDNA „Screening“ isoliert, welches auf die Isolierung neuer Säugetier-Zellzyklusregulatoren zielte (Grana et al., 1994). Solange jedoch kein entsprechender Cyclinpartner gefunden worden war, nannte man Cdk9 zunächst PITALRE aufgrund seiner PSTAIRE Sequenz, welche ein konserviertes Motiv in CDC2 und verwandten Cdks ist (Pines, 1994). Die zelluläre Funktion von P-TEFb war unbekannt, bis *drosophila* Cdk9 1997 im Labor von David Price als kleine Untereinheit von P-TEFb identifiziert wurde (Zhu et al., 1997).

Nach Identifizierung des C-Typ Cyclinpartners wurde die Kinase Cyclin abhängige Kinase (Cdk9) genannt. Die regulatorischen Untereinheiten von Cdk9 wurden zur selben Zeit unabhängig voneinander in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert. Cyclin T wurde zuerst in der Arbeitsgruppe von Katherine Jones als 87 kDa großes, Cyclin C verwandtes Protein entdeckt, welches spezifisch mit dem Transkription aktivierenden Transaktivator Protein Tat des humanen Immundefizienzvirus (HIV) interagiert (Wei et al., 1998). Zeitgleich konnten im Labor von David Price zwei verschiedene humane Cyclin T Proteine (T1 und T2) als obligate Cdk9 Partner identifiziert werden, die zusammen den positiven Elongationsfaktor P-TEFb bilden (Peng et al., 1998). Von CycT2 existieren zwei Splicevarianten eines primären Transkripts, die als CycT2a und T2b bezeichnet werden. Die drei T-Typ Cycline haben einen hoch konservierten N-Terminus, der eine zu 81% konservierte Cyclinbox beinhaltet. Zusätzlich zur N-terminalen Cyclinbox besitzt CycT1 ein mögliches „coiled coil“ Motiv, ein Histidin-reiches Motiv und eine C-terminale PEST Sequenz (Wei et al., 1998). Innerhalb der T-Typ Cycline ist jedoch der C-Terminus mit 46% viel geringer konserviert (Peng et al., 1998). Das humane Cdk9 bindet zusätzlich Cyclin K und bildet einen aktiven Komplex (Fu et al., 1999).

2.8 Rekrutierung von P-TEFb

Um auf Transkription einzuwirken, muß P-TEFb zu den RNA Pol II Komplexen gelangen. Einzelne spezifische Aktivatoren und wenigstens ein genereller Chromatin verändernder Faktor, das Bromodomäne 4 Protein (Brd4), sind bekannt, P-TEFb zu Transkriptionskomplexen zu rekrutieren (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Jedoch können spezielle Inhibitoren, wie zum Beispiel PIE-1 aus *C. elegans* diesen Effekt blockieren (Zhang et al., 2003) und die RNA Pol II trotz der Anwesenheit von P-TEFb am Promotor im Arrest belassen. P-TEFb kann durch DNA (Taube et al., 2002) ebenso wie durch RNA (Selby and Peterlin, 1990) mit der Transkriptionseinheit interagieren. Das eindeutigste Beispiel der Rekrutierung von P-TEFb ist am HIV-LTR (long terminal repeat) Promotor (Wei et al., 1998; Zhu et al., 1997). Auf dieses spezielle Phänomen wird in Kapitel 2.9.2 eingegangen.

Ein Histidin-reicher Bereich auf der C-terminalen Hälfte von CycT1 und CycT2 und eine Leucin-reiche Sequenz nahe den Cyclin Boxen in CycT2 sind notwendig für die Transkriptionsaktivierung (Kurosu et al., 2004; Taube et al., 2002). Diese Motive interagieren mit der CTD und können so als Substraterkennungsmotive für P-TEFb bezeichnet werden, wobei jedoch Cyclin K diese Motive nicht besitzt. Wird der histidinreiche Bereich aber aus CycT1 mit Cyclin K fusioniert, kann diese Chimäre Transkription aktivieren (Lin et al., 2002). Diese Studie deutet darauf hin, dass DNA Elemente, zu denen P-TEFb rekrutiert wird, den klassischen Kriterien für Enhancer entsprechen. Enhancer sind Elemente, die Transkription von Motiven aufwärts oder abwärts von den Zielgenen induzieren (Muller et al., 1988). Darauf aufbauende Studien fokussierten auf spezifische DNA gebundene Aktivatoren, die die Enhancer Funktion ihrer DNA Elemente vermitteln. Da NF- κ B zur Aktivierung des HIV1-LTR beiträgt (Nabel and Baltimore, 1987), wurde es zuerst untersucht. In Immunopräzipitations-Assays konnte gezeigt werden, dass NF- κ B tatsächlich P-TEFb rekrutiert und die Transkriptionselongation seines Zielgens erhöht (Barboric et al., 2001). NF- κ B ist nicht der einzige Aktivator, der mit P-TEFb interagiert und so Effekte eines Enhancers vermittelt. Aktivatoren wie c-Myc (Kanazawa et al., 2003), der Klasse II Transaktivator CIITA (Kanazawa et al., 2000), MyoD (Simone et al., 2002), die Steroid-Hormonrezeptoren (Lee et al., 2001) und VP16 (Kurosu and Peterlin, 2004) interagieren alle mit P-TEFb und führen so zur RNA Pol II Modifizierung. Die meisten Faktoren besitzen saure Aktivierungsdomänen und erhöhen die Initiations- und Elongationsrate. Diese Form der Rekrutierung ist spezifisch und zielt auf individuelle Transkriptionseinheiten. Trotzdem können Cdk9 Inhibitoren wie DRB oder Flavopiridol 80% der RNA Pol II Transkription inhibieren (Chao and Price, 2001), was für das Vorhandensein eines generellen TF's spricht, der P-TEFb zur RNA Pol II bringt. Bisher ist bekannt, daß P-TEFb mit Brd4 interagiert, das seinerseits mit der Mediatoreinheit assoziiert, ein Komplex, der während der Transkriptionsinitiation eine wichtige Rolle spielt. Brd4 bindet zusätzlich an acetylierte Histone, die wiederum ein wichtiges Merkmal von aktiv transkribierten Genen sind (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Obwohl P-TEFb mit den zwei Bromodomänen interagiert, ist es möglich, dass Brd4 gleichzeitig mit dem Mediator Komplex und/oder aktivem Chromatin interagiert. Der aktive P-TEFb Komplex könnte somit in Zellen acetyliert vorliegen (Peterlin and Price, 2006) und Brd4 einen generellen Rekrutierungsmechanismus darstellen. Da die Rekrutierung von P-TEFb zu Transkriptionseinheiten in der vollständigen Elongation seiner Zielgene resultiert, wird ein Mechanismus attraktiv, der durch aktive Repression

die Substraterkennung von Cdk9 blockiert. Somit könnten Inhibitoren die Interaktion zwischen P-TEFb und RNA Pol II verhindern. Kandidaten könnten Sequenzen aufweisen, die denen der RNA Pol II ähneln, selbst aber nicht phosphoryliert werden können. Werden die Ser2 und 5 der Heptadpeptide der CTD in Alanine mutiert und artifizell zur DNA gebracht, kann P-TEFb Transkription nicht mehr aktivieren (Zhang et al., 2003). In Abb. 7 sind die verschiedenen Rekrutierungsmöglichkeiten zusammengefasst.

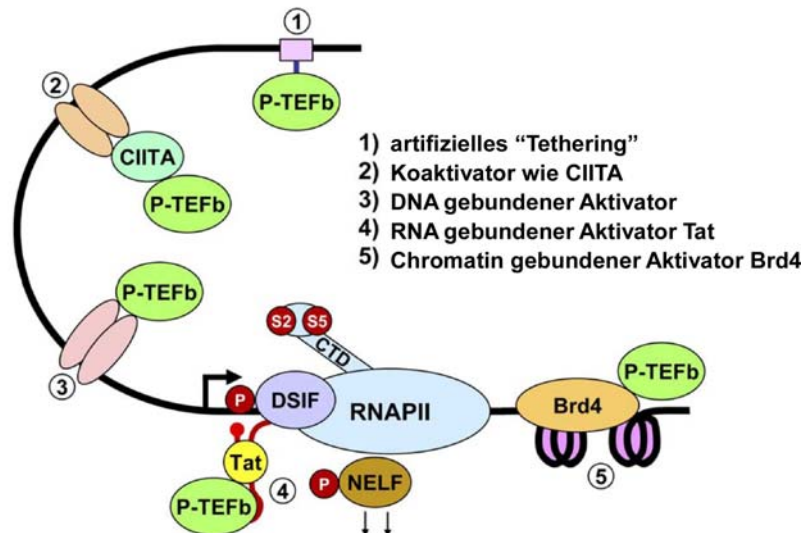


Abbildung 7: Rekrutierung von P-TEFb zu Transkriptionskomplexen. Fünf Mechanismen sind aufgezeigt, die Rekrutierung von P-TEFb zu Genen induzieren. (1) Artifizielles „Tethering“ an DNA (Gal4 DNA Bindungsdomäne), (2) der Koaktivator CIITA, (3) DNA gebundene Aktivatoren (NF- κ B, c-Myc, und nukleare Rezeptoren), (4) RNA gebundene Aktivatoren (HIV-1 Tat) und (5) Chromatin gebundener Aktivator (Brd4); (nach Price and Peterlin, 2006).

2.9 Kontrolle und Regulation von P-TEFb

Die erste Stufe der Kontrolle von P-TEFb wird durch regulierte Expression der Untereinheiten erreicht. In humanen Zellen findet man zwei Cdk9 Isoformen (Shore et al., 2003). Eine zweite 55 kDa große Isoform ist in vielen Zelltypen mit Cdk9 koexprimiert und interagiert ebenfalls mit CycT1. Als Cycline sind bisher drei Isoformen CycT1, CycT2 und Cyclin K identifiziert, die alle drei unterschiedlich reguliert werden. Obwohl es Unterschiede in der Expression gibt, sind Cdk9 und alle Cyclin T-Typen ubiquitär exprimiert. Anders als die meisten Cycline wird Cyclin T konstitutiv exprimiert und in gleichem Maße variieren P-TEFb Proteinkonzentrationen nur geringfügig im Verlauf des Zellzyklus (Garriga et al., 2003; Grana et al., 1994). Zusätzlich können post-translationale Modifikationen der Proteine Degradation induzieren. CycT1 kann ubiquitinyliert werden (Kiernan et al., 2001), was zum vermehrten Abbau führt.

Zur Aktivierung der Kinase ist wie in Kapitel 2.6 erläutert, die Bindung an das entsprechende Cyclin notwendig. Es wurde zusätzlich gezeigt, dass ATP Bindung und einhergehende Kinaseaktivität in allen Cdk's Phosphorylierung eines konservierten Threonins verlangt (Pavletich, 1999) (siehe Kapitel 2.6.1). Für P-TEFb konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung eines konservierten Threonins an Position 186 in Cdk9 zur Aktivierung essentiell ist (Chen et al., 2004; Li et al., 2005). Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus zur Inhibierung der Kinaseaktivität findet über die Assoziation mit einem von zwei RNA bindenden Proteinen und einer kleinen nukleären RNA (snRNA) statt.

2.9.1 Regulation der Transkriptionselongation durch 7SK snRNA und Hexim Proteine

Einige nicht kodierende RNAs (ncRNAs) regulieren eukaryotische mRNA Transkription. Ihr Mechanismus und ihre biologischen Rollen sind außerordentlich verschieden. RNA Moleküle sind aktive Teilnehmer in regulierenden, katalysierenden und kontrollierenden Reaktionen. Sie nehmen eine hochgeordnete Struktur an, die für ihre Funktion notwendig ist, und können durch Bindung an andere Proteine deren Aktivität manipulieren (Goodrich and Kugel, 2006).

P-TEFb ist als genereller TF für die Transkription aller Gene erforderlich. In Zellen kommen zwei Klassen von P-TEFb vor. Die aktive Form als Heterodimer, bestehend aus Cdk9 und CycT. Eine zweite, inaktive Form ist 7SK RNA gebunden. 7SK ist eine ubiquitär vorkommende (2×10^5 Kopien/Zelle) und evolutionär konservierte kleine nukleare RNA (snRNA) von 331 Nukleotiden Länge. Sie wird durch die RNA Pol III transkribiert. Die hohe Konservierung und ihre Häufigkeit sprechen für eine wichtige physiologische Funktion dieser snRNA. 7SK wurde 2001 als spezifischer P-TEFb assoziierter Faktor identifiziert (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001). Schon 1999 wurde gezeigt, dass die Aktivität verschiedener Cdk's negativ durch Faktoren reguliert wird, die entweder mit der Kinase oder dem Cyclin assoziieren (Sherr and Roberts, 1999). In HeLa Zellen liegen etwa 50% des P-TEFb Komplexes in dieser inaktiven, 7SK gebundenen Form vor (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001). Jedoch ist 7SK snRNA Bindung allein nicht ausreichend, um P-TEFb Aktivität zu inhibieren (Yik et al., 2003). Zwei Jahre nach Entdeckung der Bindung P-TEFb's an 7SK snRNA wurde zusätzlich ein P-TEFb bindendes Protein identifiziert, welches zunächst als MAQ1 (menage a quatre 1) (Michels et al., 2003) bezeichnet wurde und auch schon als Hexim1 (Yik et al., 2003)

bekannt war. Hexim1 steht für Hexamethylenbisacetamid induzierbares Protein 1 (Kusuhara et al., 1999). Hexamethylenbisacetamid (HMBA) induziert Zellproliferation und verursacht in vaskulären, weichen Muskelzellen eine Hochregulierung von Hexim1, was mit Wachstumsarrest und Unterdrückung der NF- κ B abhängigen Genexpression einhergeht (Ouchida et al., 2003). Verschiedene Zellstress-Bedingungen wie Actinomycin D oder DRB führen zur Dissoziation des inaktiven Komplexes, was zur Aktivierung der Kinase führt und somit zur Stimulation der RNA Pol II Elongation (Yik et al., 2003). Ein verwandtes Protein, Hexim2, besitzt ähnliche Eigenschaften wie Hexim1 (Byers et al., 2005; Yik et al., 2005). Hexim1 und Hexim2 bilden Homodimere (Schulte et al., 2005; Yik et al., 2005), die nach einer Konformationsänderung durch 7SK Bindung in der Lage sind, P-TEFb zu binden (Blazek et al., 2005; Dulac et al., 2005; Egloff et al., 2006; Li et al., 2005) (Abb. 8). Obwohl HeLa Zellen vorherrschend Hexim1 exprimieren, führt Hexim1 Verlust nicht zur Freisetzung von P-TEFb, sondern wird durch Hexim2 ersetzt (Byers et al., 2005). Die Stöchiometrie der Moleküle des inaktiven Komplexes ist derzeit Gegenstand intensiver Diskussion.

Bestimmte zelluläre Prozesse, die durch eine Erhöhung der Transkriptionsrate gekennzeichnet sind, werden durch Änderungen in der P-TEFb Verfügbarkeit moduliert. Eine Möglichkeit, die Menge an aktivem P-TEFb zu regulieren, könnte über Phosphorylierung stattfinden. Eine Studie hat gezeigt, dass Phosphorylierung des T186 in Cdk9 für die Interaktion mit 7SK snRNA notwendig ist (Chen et al., 2004). Diese Phosphorylierung wird im Unterschied zu anderen Kinasen nicht durch Autophosphorylierung oder eine generelle Cdk aktivierende Kinase (CAK) ausgelöst, sondern vermutlich von einer noch zu identifizierenden nukleären Kinase (Chen et al., 2004). Es ist ebenso bekannt, dass die Phosphorylierung des konservierten Threonins generell für die Aktivierung aller Cdk's essentiell ist. Dieses Ereignis könnte hier anders als bei den bisher untersuchten Kinasen ebenso für die Inhibierung durch 7SK und Hexim1 von Bedeutung sein. Um diese paradoxe Beobachtung zu verstehen, müssen weitere Studien folgen, welche die Identifizierung der spezifischen Kinase und strukturelle Untersuchungen einschließen.

Die molekularen Details der Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 durch Hexim1 und 7SK snRNA sind erst unvollständig geklärt und damit Gegenstand intensiver Forschung. So wird die Verdrängung des ATP Nukleotids aus der Bindungstasche der Kinase durch einen Tyrosinrest in Hexim1 (Li et al., 2005; Michels et al., 2004) diskutiert, analog zu einem Mechanismus, der bei der Inhibierung von Cdk2/CyclinA durch p27^{Cip} stattfindet (Pavletich, 1999).

Ebenso waren die molekularen Interaktionen der Moleküle im Komplex zu Beginn dieser Arbeit erst unvollständig geklärt. Es war bekannt, dass Hexim1 spezifisch an 7SK snRNA über ein Arginin-reiches Erkennungsmotiv bindet, welches in vielen RNA-bindenden Proteinen existiert (Michels et al., 2003; Michels et al., 2004; Yik et al., 2003). Für die Bindung an P-TEFb sind in der 7SK snRNA hauptsächlich die 3'- und 5'-Haarnadelschleifen verantwortlich (Egloff et al., 2006). Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Interaktion zwischen Hexim1 und CycT1.

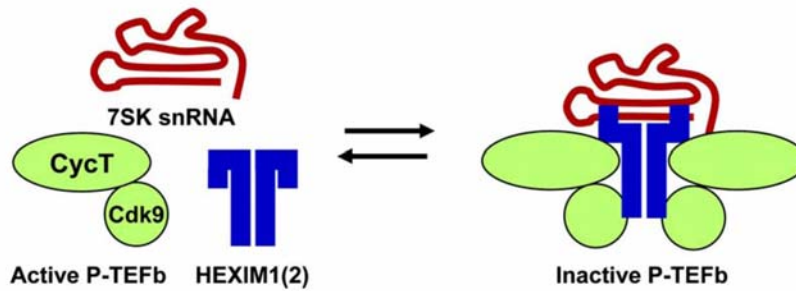


Abbildung 8: Negative Regulation von P-TEFb Komplexen. P-TEFb ist inaktiv nach reversibler Bindung an Hexim1 und 7SK. Bindung eines Hexim Dimers an 7SK snRNA verursacht Konformationsänderungen, die Domänen freilegen, die zur P-TEFb Bindung notwendig sind. Die Assoziation führt zur Inhibierung der Cdk9-Kinaseaktivität.

2.9.2 Rolle von P-TEFb in HIV-1 Expression

Die funktionale Bedeutung von P-TEFb für die Genexpression wurde zuerst am Beispiel der HIV Genexpression deutlich. HIV-1 benötigt zur Expression der eigenen Gene das virale Transaktivatorprotein Tat, um die Prozessivität der RNA Pol II nach erfolgter Initiation am HIV LTR (lange terminale Sequenzwiederholungen an viralen Promotoren) zu stimulieren. In Abwesenheit des Transaktivators Tat werden nur kurze RNA Transkripte generiert (Tao and Frankel, 1992), denn die RNA Pol II bricht die RNA Synthese frühzeitig ab. Das Tat Protein agiert über Bindung an die entstehende RNA Transkriptstruktur. Die RNA Struktur, die sich kurz nach Initiation am 5' Ende ausbildet, wird „Transaktivations-Response-Element“ (TAR) genannt (Cullen, 1994; Jones and Peterlin, 1994; Price, 2000; Taube et al., 1999). Noch vor der Identifizierung der P-TEFb Untereinheiten wurde entdeckt, dass Tat einen zellulären Kofaktor für die Interaktion mit dem TAR Element benötigt. 1997 konnte gezeigt werden, dass Cdk9 ein Bestandteil dieses Cofaktors ist (Yang et al., 1997; Zhu et al., 1997). Ein Jahr später identifizierten Wei et al. (1998) CycT1 als ein Tat bindendes Protein. Durch die kooperative Bindung des Tat/CycT1 Komplex an TAR gelangt auch Cdk9 in die Nähe der RNA Pol II. Durch folgende Phosphorylierung der CTD der RNA Pol II durch Cdk9 wird die Transkriptionselongation der HIV-1 Gene stimuliert (Zhu et al., 1997). Bemerkenswert ist, dass von den drei Cyclinen, die Cdk9 binden, nur humanes CycT1 mit Tat interagiert (Napolitano et al., 1999).

Es wird vermutet, dass ein Cystein an Position 261 in humanem CycT1 für die CycT1-Tat Interaktion zur Bildung eines intermolekularen Zinkfingers notwendig ist (Garber et al., 1998). Zur P-TEFb Rekrutierung bindet Tat zusätzlich die 5' „bulge“ in TAR über sein Arginin-reiches Motiv (ARM; Karn, 1999). CycT1 bindet die zentrale Schleife in TAR über sein basisches Tat-TAR Erkennungsmotiv (TRM), was auch das nukleare Lokalisationssignal (NLS) beinhaltet (Garber et al., 1998). Zur Bildung eines hochaffinen P-TEFb/Tat/TAR Komplexes ist zusätzlich die Autophosphorylierung von Cdk9 notwendig (Garber et al., 2000) (Abb. 9). Nach Rekrutierung phosphoryliert P-TEFb identisch zur Transkription der eigenen Gene Spt5 aus DSIF (Ivanov et al., 2000), RD aus NELF (Fujinaga et al., 2004) und Ser2 der CTD der RNA Pol II (Isel and Karn, 1999). NELF dissoziiert von TAR

(Fujinaga et al., 2004) und P-TEFb kann mit phosphoryliertem DSIF die elongierende RNA Pol II begleiten (Ping and Rana, 2001).

P-TEFb ist notwendig für die Produktion langer mRNA Transkripte *in vitro*. In der HIV-1 Transkription ist dieser Komplex ebenso von entscheidender Bedeutung. Die Regulation findet auch hier auf der Ebene der Elongation statt. Die anfängliche virale Transkription und Tat Synthese wird vermutlich durch NF- κ B Aktivierung von P-TEFb induziert (Peterlin and Price, 2006). Nachdem genügend Moleküle an Tat erzeugt wurden, kann die Rekrutierung von P-TEFb via Tat und TAR geschehen und so in intensiver viraler Synthese resultieren.

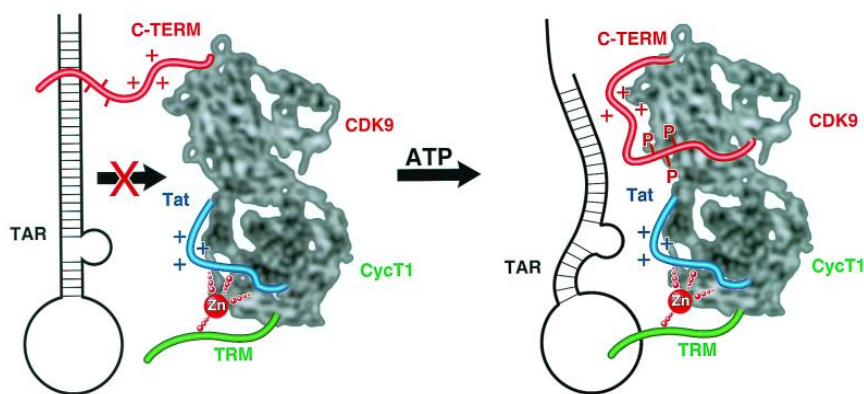


Abbildung 9: P-TEFb reguliert HIV-1 Expression über Rekrutierung von P-TEFb an die TAR RNA Haarnadelstruktur. Modell der Bindung von P-TEFb an die TAR RNA über Interaktion mit HIV-1 Tat. Als Basis für die Darstellung diente das Rückgrad der CyclinA/Cdk2 Komplexstruktur. Das Tat/TAR Erkennungsmotiv von CycT1 (TRM, grün) bildet eine Zink abhängige Interaktion mit HIV-1 Tat aus und ist an der direkten Bindung der RNA über ihre zentrale Schleife beteiligt, möglicherweise über Arginine und hydrophobe Aminosäuren des TRM in CycT1 (Garber et al., 1998). Die Tat Aktivierungsdomäne (blau) interagiert mit CycT1 teilweise über den intermolekularen Zinkfinger und ebenso über Reste des TRM. Tat bindet die TAR RNA über ihre 5' „bulge“. Im unphosphorylierten Zustand ist keine Bindung von Cdk9 an die TAR RNA nachzuweisen. Im autophosphorylierten Zustand dagegen ermöglichen Konformationsänderungen die Bildung eines hochaffinen Komplexes (Quelle Garber et al., 2000).

2.9.3 Physiologische Bedeutung der P-TEFb Regulation

P-TEFb spielt eine Schlüsselrolle in zellulärer Aktivierung, Proliferation und Zelldifferenzierung. Aufgrund dieser Funktionen nimmt es eine zentrale Stellung in normalen sowie kranken Zuständen in Zellen ein. Dabei reicht das Spektrum der Erkrankungen, die mit einer Fehlregulation von P-TEFb verbunden sind, von Herzmuskelhypertrophie bis hin zu Krebs. Ebenso ist es essentiell für die HIV Transkription.

Die Freisetzung und Aktivierung von P-TEFb spielt in der Pathogenese von Herzmuskelhypertrophie eine Rolle. Diese Krankheit ist durch eine Vergrößerung der Herzmuskelzellen charakterisiert, die durch eine globale Erhöhung der Transkriptionsrate und des so einhergehenden Proteingehalts in diesen Zellen ausgelöst wird. P-TEFb Aktivität ist limitierend für normales Herzzellwachstum. Hypertrophische Signale induzieren die Dissoziation von der 7SK RNA und Hexim1 von P-TEFb und stimulieren die RNA Pol II Transkription (Heineke and Molkentin, 2006; Sano et al., 2002).

Entdeckt wurde Hexim1 fast zeitgleich in einem onkologischen Zusammenhang als ein Inhibitor des Wachstums von Brustkrebszellen (Wittmann et al., 2003). In diesen Zellen reduziert Estrogen die Hexim1 Konzentration (Wittmann et al., 2005). Deshalb wurde Hexim1 in diesen Studien „Estrogen down regulated gene 1“ (EDG1) genannt. EDG1 Mengen sind in normalen Brustepithelzellgeweben viel höher als in Tumorgewebe. Hexim1 und Hexim2 Proteine sind auf dem Chromosome 17q21.31 lokalisiert, auf dem auch das Tumorsuppressorgen BRCA1 liegt. Es wird vermutet, dass Hexim2 im Unterschied zu Hexim1 keine autoregulatorische Domäne besitzt und deshalb aktiver in der P-TEFb Inhibierung ist (Li et al., 2005).

2.10 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Transkriptionselongation geleistet werden. Hierzu sollen eukaryotische Proteine, die regulatorisch in den Transkriptionszyklus eingreifen, funktionell und strukturell charakterisiert werden. Zur Analyse werden dabei biochemische, biophysikalische und strukturelle Methoden eingesetzt. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf Untersuchungen zum bereits erwähnten positiven Transkriptionselongationskomplex P-TEFb, der in kranken sowie in gesunden Zellen eine zentrale Rolle in der Transkription einnimmt. Ein thematisch davon abgegrenzter Teil dieser Arbeit behandelt die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne des später beschriebenen humanen Forminproteins FHOD1.

Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass P-TEFb's Kinaseaktivität durch Bildung eines inaktiven Komplexes inhibiert wird. Dieser inaktive Komplex – bestehend aus Cdk9, CyclinT1, Hexim1 und 7SK snRNA – ist Gegenstand dieser Arbeit. Die bisherigen Untersuchungen über diesen Komplex sind zellbiologischer und molekularbiologischer Art. Ein erstes Ziel dieser Studie fokussiert auf der Bestimmung der Bindungsfläche und Bindungseigenschaften des Hexim1 Proteins mit dem CycT1 Protein als Bestandteil des inaktiven P-TEFb Komplexes. Dazu sollen die Bereiche der Interaktion *in vitro* identifiziert und charakterisiert werden. Rekombinante Fragmente beider Proteine sollen hergestellt und die Interaktion der Domänen mit biochemischen und

biophysikalischen Methoden analysiert werden. Die Stöchiometrie des CycT1/Hexim1 Komplexes ist eine weitere Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit. Durch Mutationsstudien des Hexim1 Proteins sollen die an der Bindung zu CycT1 beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Diese Studie soll ebenso mit biochemischen und biophysikalischen Methoden durchgeführt werden. Anschließend sollen diese Konstrukte *in vivo* in Kollaboration in der Arbeitsgruppe von Prof. Matija Peterlin, Department of Medicine der UCSF, von Dr. Matjaz Barboric untersucht werden, um den Einfluss dieser Aminosäuren auf die Aktivität des Elongationsfaktors in eukaryotischen Zellen zu erkennen.

Parallel zu den biochemischen Arbeiten soll der Komplex strukturell charakterisiert werden. Mittels Röntgenstrukturanalyse sollen die zuvor biochemisch charakterisierten stabilen Fragmente der einzelnen Proteine Hexim1 und CycT1 und ebenfalls im Komplex zur Kristallisation und möglichen Strukturaufklärung eingesetzt werden. Die kristallographischen Studien sollen sowohl in Zusammenarbeit mit Dr. Kanchan Anand, EMBL Heidelberg, als auch direkt am Max-Planck Institut stattfinden.

Mit Hilfe dieser Studien sollen Einblicke in die molekularen Mechanismen der Inhibition und Aktivierung von P-TEFb geschaffen werden. Insbesondere die Funktion des Cyclins T1 bei der HIV-1 Transkription ist hier von Interesse. Zur Analyse der Bindung des Cyclins an das virale Transaktivatorprotein Tat und das virale RNA Transkript TAR sollen Fusionskonstrukte aus CycT1- und Tat Fragmenten generiert und rekombinant hergestellt werden. Verschiedene TAR RNA Konstrukte sollen hergestellt und ihre unterschiedlichen Bindungseigenschaften zum CycT1-Tat Komplex sollen durch elektrophoretische Gelverschiebungstests (EMSA) charakterisiert werden. Schließlich sollen die Bindungsflächen auf CycT1 zwischen dem inhibitorischen Hexim1 Protein und dem aktivierenden Tat Protein mit biochemischen Methoden verglichen werden. Damit einhergehend sollen kristallographische Studien des aktivierenden Komplexes aus CycT1, Tat und der TAR RNA stattfinden.

In einem weiteren Projekt soll unabhängig von den oben genannten Arbeiten die Struktur der N-terminalen Domäne des FHOD1 Proteins mit kristallographischen Methoden bestimmt werden und anhand dieser Struktur die Funktion dieser Domäne näher beschrieben werden. Von besonderem Interesse sind hier die regulatorischen Eigenschaften dieser Domänen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Firmen bezogen: Aldrich (Steinheim), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), GE Healthcare (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München).

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

PVDF-Membran (GE Healthcare, Freiburg)
Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, Freiburg)
Dialyseschläuche (Roth, Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten (Invitrogen, Karlsruhe)
Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.)
Ultrafiltrationseinheiten (Millipore Amicon, Witten)
NMR Röhrchen (Wilmad, Buena, USA und Shigemi Co., LTD Tokyo Japan)
Kristallisationsscreens (Hampton Research und Qiagen, Hilden)

3.1.2 Chromatographiesäulen und –materialien

Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden)
GSH 4 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg)
Hi Load™ Superdex™ 75 16/60 prep grade (GE Healthcare, Freiburg)
Hi Load™ Superdex™ 200 16/60 prep grade (GE Healthcare, Freiburg)
Superdex™ 75 10/300 (GE Healthcare, Freiburg)
Superdex™ 200 10/300 (GE Healthcare, Freiburg)
PD 10 Säulen (GE Healthcare, Freiburg)
Biosep-SEC-S2000 (Phenomenex, Aschaffenburg)

3.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

1,5-IAEDans (Molecular Probes, Eugene, OR)

3.1.4 Reagenzienansätze

QIAprep Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
QIAprep Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
QIAprep Plasmid Midiprep Kit (Qiagen, Hilden)
ECL Western Blot Detection Kit (GE Healthcare, Freiburg)

3.1.5 DNA-Konstrukte

Marker

DNA Low Molecular Weight Marker (Invitrogen, Karlsruhe)
10000, 8144, 6108, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 514/506 bp

Oligonukleotide

Primer (MWG Biotech, München und Metabion, Martinsried)

Vektoren

pProEx-HTa-c (Invitrogen)
pGEX-4T1 Tev-site modifiziert (GE Healthcare, Freiburg)
pGEX-2T Tev-site modifiziert (GE Healthcare, Freiburg)
pET-Duet (Novagen, Darmstadt)
pEF-HA (Dr. Geyer, MPI Dortmund)

3.1.6 Enzyme, Proteine und Antikörper

Enzyme

Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach)
DNase I (New England Biolabs, Schwalbach)
Expand High Fidelity PCR System Polymerase (Roche, Mannheim)
T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach)
Tev Protease (MPI Dortmund)
Thrombin (Sigma, München)

Peptide

DAD Peptid mit 30 Aminosäuren (MW: 3357.8 Da), synthetisiert am MPI Dortmund von Dr. Christian Becker; Sequenz: SDEIMDLLVQSVTKSSPRALAARERKRKRSRG;
DAD Peptid mit 14 Aminosäuren (MW: 1576.8 Da), synthetisiert von der Firma Biosynthan, Berlin; Sequenz: SDEIMDLLVQSVTK

Antikörper

polyklonaler Kaninchen- α -His-Anikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)
HA-probe (F-7) mouse monoclonal IgG2a (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

Marker

Proteinstandard für SDS-Page (GE Healthcare, Freiburg)
97000 Da (Phosphorylase b), 66000 Da (Albumin), 45000 Da (Ovalbumin), 30000 Da (Carbonic Anhydrase), 20100 Da (Trypsin Inhibitor), 14400 Da (Lactalbumin)
Proteinstandard für die Größenausschlusschromatographie (Amersham Bioscience, Freiburg)
Proteinstandard für analytische Gelfiltration (Bio-Rad, München)
670000 Da (Thyroglobulin), 158000 Da (bovine γ -Globulin), 44000 Da (chicken Ovalbumin), 17000 Da (equine Myoglobin), 1350 Da (Vitamin B12)

3.1.7 Geräte

Autoklav Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleissheim)
 Brutschrank Heraeus CO₂ Autozero (Heraeus, Hanau)
 ESI-Massenspektrometer Agilent 1100 (Hewlett Packard, Texas, USA)
 FluoroMax-3 Spectrofluorometer (SPEX Instruments, Edison, U.K.)
 FPLC: Äkta™prime (GE Healthcare, Freiburg)
 GenePulsers (Bio-Rad, München)
 HPLC 600S Controller, 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters 717plus Autosampler (Waters, Milford, USA)
 konfokales Mikroskop (Zeiss, Göttingen)
 Kühlzentrifuge 5810R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
 Massenspektrometer Voyager-DE pro MALDI (Perspective Biosystems, Weiterstadt)
 Microfluidizer M-110S (Microfluidics Corp., Newton, U.K.)
 Microkalorimeter: VP-ITC (Microcal, Northampton, U.K.)
 Mikroskop: Axiolab (Carl Zeiss, Jena)
 NMR Spektrometer: Varian Inova 600 Spektrometer (Varian Inc., USA)
 PAGE Gelkammer: Bio Rad Mini-Protean III (Bio-Rad, München)
 PCR-Express (Hybaid, Heidelberg)
 Photometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
 Schüttler (Brunswick, Nürtingen)
 Semi-Dry Trans-Blot Apparatur (Biometra, Göttingen)

3.1.8 Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie

Medien und Zusätze prokaryotischer Zellkultur

LB-Medium: 10 g Pepton(140)Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1000ml, pH 7.2
 Le Master Medium: je Liter 0.5 mg Alanin, 0.58 mg Arginin HCl, 0.4 mg Aspartat, 0.033 mg L-Cystein, 0.750 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, Valin, 0.5 Adenin, 0.67 mg Guanosin, 0.17 mg Thymine, 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 folgenden Lösungen sterilfiltriert dazugeben: 10 mg D-Glucose, 0.25 mg MgSO₄-7H₂O, 4.2 mg FeSO₄, 8 μ l H₂SO₄ (liquid), 0.005 mg Thiamin

Medien und Zusätze eukaryotischer Zellkultur

Fötale Kälberserum (Sigma, München)
 Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (GibcoBRL, Egenstein)

Antibiotika

Penicillin (GibcoBRL, Egenstein), Streptomycin (GibcoBRL, Egenstein), Ampicillin (Serva, Heidelberg), Kanamycin (Serva, Heidelberg)

3.1.9 Mikroorganismen und Zelllinien

prokaryotische Zelllinien

E.coli-Stamm: **TG1** (Zymo Research CA) (Carter et al., 1985)

Genotyp: lac-pro, thi-1, supE, hsd Δ 5, [F' tra Δ 36, proAB+, lacIQ, lacZ.M15]

E.coli-Stamm: **BL21(DE3)** (Novagen, Darmstadt) (Studier und Moffat, 1986)

Genotyp: F-omp T hsdS_B (r_B m_B) gal dcm rne 131 (DE3)

eukaryotische Zelllinien

HeLa (Humane Cervix Karzinom Zelllinie)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Gerichtete Mutagenese

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung eines zwischen zwei Oligonukleotiden liegenden DNA-Abschnitts. Sie setzt sich aus einer wiederholten Abfolge von Zyklen zusammen, die aus je drei Reaktionsschritten aufgebaut sind. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in die Einzelstränge getrennt, es folgt die Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären DNA-Stränge und anschließend die Synthese der DNA mit einer besonders hitzestabilen Polymerase vom freien 3' Hydroxyende der Primer aus.

Bestandteil	Konzentration	Volumen (μ l)
Matrizen-DNA	ca. 200 ng/ μ l	1
dNTP	2.5 mM	4
Primer	10 pmol/ μ l	1
Primer	10 pmol/ μ l	1
<i>expand high fidelity</i>		
Polymerase	5000 U/ml	0,5
Polymerasepuffer	10x	5
ddH ₂ O		38

Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (s)
Denaturierung	96	120
25x Denaturierung	94	15
25x Hybridisierung	T _{Hyb} (45-55)	30
25x Elongation	72	45 - 60
abschließende Elongation	72	420

Die Hybridisierungstemperatur berechnet sich aus folgender Formel:

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

Einführung von Punktmutationen mit der Megaprimer-PCR

Zur Einführung einzelner Punktmutationen in die DNA Matrix wurde die Methode der Megaprimer-PCR verwendet. Bei dieser Methode werden in einer ersten PCR Runde die mutationstragenden Megaprimer generiert, die in der zweiten Runde zusammengebracht werden, um das vollständige Gesamtfragment zu amplifizieren. Für die Herstellung der Megaprimer wurden zwei PCR Ansätze angesetzt. Ein Ansatz enthielt den Start-Primer und den mutationstragenden antisense-Primer, der zweite Ansatz enthielt entsprechend den mutationstragenden sense-Primer und einen Stopp-Primer.

Die entstehenden Megaprimer wurden durch Agarosegelelektrophorese von der Template DNA und den mutationstragenden Primern getrennt und in einer dritten PCR Reaktion mit den flankierenden Primern zur Generierung des Gesamtfragmentes eingesetzt.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Fragmente können durch Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die DNA wandert aufgrund ihrer negativen Ladung zur positiven Anode. Nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurde die Agarosegelelektrophorese zur weiteren Reinigung der DNA verwendet, nach einem Verdau aufgereinigter DNA diente sie zur Kontrolle der Klonierung. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelsystemen der Firma BIORAD bei einer konstanten Spannung von 110 V. Die Konzentration der Gele betrug je nach Größe des zu untersuchenden DNA-Fragmentes zwischen 0.6 – 3.0%. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/6 Auftragepuffer (6x), entweder Bromphenolblau bzw. Xylencyanol, versetzt. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen wurde ein Längenstandard, eine 1 kb DNA Leiter (Invitrogen), auf das Gel aufgetragen. Sowohl der Laufpuffer als auch die Gele wurden aus TB mit 0.01% Ethidiumbromid hergestellt, welches schon während des Laufs in die DNA interkaliert. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte im Anschluss durch Anregung des Ethidiumbromids mit UV-Licht.

3.2.3 Restriktion von Plasmid-DNA

Die PCR amplifizierten und durch Agarosegelelektrophorese getrennten DNA-Fragmente müssen vor Ligation mit einem anderen Fragment bzw. vor Ligation in einen Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut werden. Diese Enzyme binden und spalten doppelsträngige DNA an den für sie spezifischen, meist palindromischen Sequenzen. Die Aktivität der Enzyme ist unter anderem von dem eingesetzten Restriktionspuffer und der Temperatur abhängig. Sind die Bedingungen für zwei Enzyme miteinander kombinierbar, dann kann ein gleichzeitiger Verdau mit beiden erfolgen. Der Restriktionsverdau wurde ebenfalls zu analytischen Zwecken, d.h. zur Kontrolle der Klonierung eingesetzt. Der Verdau erfolgte bei 37°C für mindestens zwei Stunden oder über Nacht.

3.2.4 Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kits. Unter Hochsalzbedingungen binden Nukleinsäuren an die in den Säulen befindliche Silicamembran. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte nach zwei Waschschritten mit Tris-Puffer oder Wasser. Das Elutionsvolumen betrug 32 µl, falls noch ein Restriktionsverdau angeschlossen werden sollte, und 50 µl nach erfolgtem Verdau.

3.2.5 Ligation

Zwei mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnittenen Nukleinsäuren können durch das Enzym Ligase kovalent verknüpft werden. Die Ligase katalysiert die Reaktion eines freien 3`-Hydroxy- mit einem 5`-Phosphatende. Die Ligation wurde bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden, aber nicht länger als über Nacht durchgeführt. Folgender Standardansatz wurde zur Ligation eines verdauten PCR-Fragmentes mit einem verdauten Vektor verwendet.

Bestandteil	Volumen
geschnittener Vektor	1 µl
geschnittenes PCR-Fragment	8 µl
Ligationspuffer 10x	2 µl
T4 Ligase	1 µl
Aqua dest	8 µl

3.2.6 Transformation von Bakterien

Die Zellmembran hitzeresistenter *Escherichia coli* Zellen wurde durch Behandlung mit DMSO für DNA permeabel gemacht. Die Zellen werden durch diese Behandlung zur Aufnahme von DNA kompetent und nehmen bei 42°C DNA auf. Zur Transformation eines Ligationsansatzes wurden 150 µl TG1 Zellen mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und nach einer Inkubationszeit von mindestens 20 min auf Eis für 1 min einem Hitzeschock unterzogen. Zur Transformation eines Plasmids wurden *E.coli* BL21(DE3) bzw. *E.coli* BL21(DE3)-RIL Zellen verwendet. 1 µl Miniprep-DNA wurde mit 70-100 µl Zellen vermischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Direkt nach dem Hitzeschock wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für eine Kotransformation wurde entsprechend je 1 µl der Plasmid Miniprep-DNA eingesetzt. Die Menge der Zellen betrug auch hier 70-100 µl. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen jedoch nicht direkt ausplattiert, sondern mit 600 µl LB-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden bei 5000 rpm für 1 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach Abnehmen von ca. 500 µl LB Medium, wurden die Zellen in dem restlichem Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Auch hier wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Isolierung der Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden TG1 Zellen verwendet, die in LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen wurden. Man unterscheidet zwischen drei Präparationsarten, der Mini-, Midi- und Maxipräparation. Diese Unterscheidung basiert auf der Menge der angezogenen Kultur, d.h. der Menge DNA, die gereinigt werden soll. Für die Reinigung wurden Qiagen Kit Systeme eingesetzt. In diesen werden die Bakterien zunächst nach dem Verfahren der alkalischen Hydrolyse (Birnboim) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation wird das Lysat geklärt und unter Hochsalzbedingungen auf eine Silicamembran gegeben, die eine hohe Affinität zu DNA besitzt. Nach einem Waschschrift erfolgt die Elution der DNA in einem Niedrigsalzpuffer. Die Reinigung erfolgte gemäß des Protokolls im Qiagen-Plasmid-Purification Handbook.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Bei dieser Methode werden durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Desoxyoligonukleotiden in einem PCR Ansatz basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente hergestellt, die anschließend elektrophoretisch getrennt und detektiert werden. Da jedes Desoxyoligonukleotid mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, lassen sich die Basen eindeutig zuordnen und aus der Reihenfolge der detektierten Basen kann das Chromatogramm erstellt werden.

Für die Sequenzierungs-PCR wird ein Big-Dye Terminator Mix verwendet, welcher die AmpliTaq DNA Polymerase sowie die vier markierten ddNTPs enthält. Die Zusammensetzung eines Ansatzes lautet wie folgt:

Bestandteil	Volumen
Terminator Mix	4 µl
Sequenzierungspuffer	2 µl
DNA (Mini-Spin-Präp.)	3 µl
Primer	1 µl
Aqua dest	10 µl

Die PCR hatte folgendes Programm:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sek)
25x Denaturierung	96	10
25x Hybridisierung	55	5
25x Elongation	60	240

Im Anschluss an die PCR wurde die DNA gefällt und gereinigt. Für die Fällung wurden dem Ansatz 2 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M NaAc und 50 µl 100% EtOH zugefügt. Der Ansatz wurde durchmischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine zehninütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Tischzentrifuge). Nach Entnahme des Überstandes schloss sich ein Waschschriff mit 400 µl 70% EtOH an. Wieder wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNS-Pellet wurde an der Luft getrocknet und hausintern sequenziert.

3.2.9 Glycerindauerkulturen

Bakterienzellen können in 50% v/v Glycerol bei -80°C stabil über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Aus diesem Glycerolstock kann dann ohne der Notwendigkeit einer neuen Transformation direkt eine Kultur inokuliert werden. Zur Herstellung eines Glycerolstocks wurde von einem Klon, der aus einer frischen Transformation hervorging, eine 3 ml LB Kultur mit dem entsprechenden Selektivitätsmarker angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.8 bei 37°C angezogen. 1200 µl dieser Kultur wurden mit 800 µl 50% v/v Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinexpression und Zellernte

Für die Proteinexpression wurden BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)-RIL Zellen eingesetzt. Bei letzteren ist die Verwendung von Chloramphenicol im Medium bis zur Hauptkultur notwendig, um die Anwesenheit des Plasmids pACYC in den Zellen zu gewährleisten. Aus einem Glycerolstock der Zellen wurde eine Vorkultur angesetzt, mit welcher am nächsten Tag Selektionsmarker enthaltendes LB-Medium mit einer OD_{600} von 0.05-0.1 inokuliert wurde. Die Expression fand in zwei bzw. fünf Liter Erlenmeyerkolben statt. Um einen ausreichenden Sauerstoffgehalt zu garantieren, wurden die Kulturen fortwährend bei ca. 180 rpm geschüttelt. Das Anziehen der Zellen erfolgte bei 37°C. Die Temperatur wurde dann frühzeitig auf die Expressionstemperatur abgesenkt, so dass die Zellen vor Induktion mindestens einen Zellzyklus bei der neuen Temperatur durchlaufen konnten. Die Induktion der Zellen fand bei einer OD_{600} von 0.8-1.0 mit 0.1 mM IPTG statt. Dabei richtete sich die Dauer und Temperatur der Expression nach der Stabilität und Löslichkeit der zu exprimierenden Proteine. Für die Selenomethionin-Expression wurden die Zellen in LeMaster Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0.5 wurden 50 mg/l Selenomethionin zu der Zellkultur gegeben und nach 15 minütiger Inkubation die Zellen induziert. Die Expression erfolgte bei 30°C für 3-4 h, um eine Oxidation des Selenomethionins zu verhindern.

Nach Erreichen der Expressiondauer wurden die Zellen für 20 min bei 5000 rpm geerntet. Das Zellpellet wurde in PBS (150 mM NaCl, 10 mM NaP_i , pH 7.2) resuspendiert und erneut bei 5000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.2 Zellaufschluss

Die Reinigung des exprimierten Proteins setzt den Aufschluss der Bakterienzellen voraus. Dieser erfolgte mechanisch mit Hilfe eines Microfluidizers oder durch Verwendung eines Ultraschallgerätes (Sonicator). Für beide Verfahren wurde das Pellet in Lysispuffer resuspendiert. Für den Aufschluss mit dem Ultraschallgerät wurde je nach Volumen der aufzuschließenden Lösung eine Arbeitsspitze bzw. eine 5 mm Spitze eingesetzt. Das Zellysate wurde zur Klärung 30 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand für die anschließende säulenchromatographische Proteinreinigung eingesetzt.

3.3.3 Nickelaффinitätschromatographie

Zur Vereinfachung der Proteinreinigung wurden die Proteine rekombinant als Fusionsproteine mit einem His- oder GST-Aффinitätsanker hergestellt und dann über eine Affinitätschromatographiesäule als ersten Schritt gereinigt. Die verwendeten Affinitätssäulen enthielten Ni-NTA bzw. GSH-Sepharose. Als Säulenmaterial wurde Nickel-Nitrilo-triessigsäure (NTA) der Firma Qiagen verwendet. NTA bindet Ni^{2+} -Ionen, wobei es vier der sechs Ligandenbindungsstellen des Ni^{2+} -Ions besetzt. Die anderen zwei Bindungsstellen sind frei zugänglich und stehen für die Ausbildung eines Chelatkomplexes mit zwei Histidinresten des Fusionsproteins zur Verfügung. Diese Methode wird

deshalb auch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie genannt. Nach Zellyse und Zentrifugation wurde der Überstand auf die mit Laufpuffer äquilibrierte Säule mit einem Fluss von 1-2 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit ausreichend (400 ml) Laufpuffer gewaschen, der 20 mM Imidazol enthält. Durch die Verwendung von geringen Konzentrationen Imidazol im Puffer sollte die unspezifische Bindung von Proteinen an die Säulenmatrix unterbunden werden. Die Elution des Proteins erfolgte mit Laufpuffer einer Imidazolkonzentration von 200 - 400 mM. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert. Proteinenthaltende Fraktionen wurden vereint und gegen einen Puffer ohne Imidazol dialysiert.

3.3.4 Glutathionaffinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit einem Glutathion-S-Transferase-Anker erfolgte mit Glutathion-Sepharose Säulen, bei denen Glutathion durch einen Linker (Oxirangruppe) kovalent an Sepharose gekoppelt ist. Glutathion-S-Transferase und Glutathion bilden ein Enzym/Substrat Paar, auf deren Bindung die säulenchromatographische Reinigung der Proteine beruht. Für die Reinigung wurde der Zellüberstand mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Mit Laufpuffer wurde bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen, optional schloss sich ein Waschschrift mit 500 mM Salz an. Durch diesen Waschschrift sollten unspezifisch gebundene Proteine abgetrennt werden. Die Elution erfolgte mit Laufpuffer, der 20 mM Glutathion enthält. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert und die proteinenthaltenden Fraktionen vereint.

3.3.5 Präparative Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie trennt Biomoleküle anhand ihrer unterschiedlichen Größe und Form. Dabei wird eine poröse Matrix mit definierter Porengröße verwendet, in diesem Fall wurden Sephadexsäulen eingesetzt. Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Permeation der Biomoleküle in die Poren der Matrix. Große Moleküle können nicht in die Poren eindringen und eluieren im Ausschlussvolumen, dagegen dringen kleine Moleküle in die Poren ein und erfahren eine Verzögerung, wodurch sie erst bei einem größeren Lösungsmittelvolumen eluieren. In dieser Arbeit wurde die Größenausschlusschromatographie sowohl für präparative als auch für analytische Zwecke eingesetzt. Die präparative Größenausschlusschromatographie wurde oft als letzter Reinigungsschritt von Proteinen eingesetzt. Hierzu wurden die Proteine bis auf ein Volumen von 0.5 bis 1.5 ml aufkonzentriert und auf eine mit Laufpuffer äquilibrierte Sephadex 16/60 Säule gegeben. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0.5 - 1.5 ml/min Die Fraktionen wurden gesammelt und gelelektrophoretisch analysiert. Die verwendeten Puffer besaßen einen Salzgehalt von mindestens 150 mM NaCl.

3.3.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach dem von Laemmli (Laemmli, 1970) eingeführten SDS-haltigen, diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem. Bei diesem liegt über einen weiten Bereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Laufstrecke der Proteine vor. Die Zuordnung der Molekulargewichte erfolgte durch Verwendung eines Molekulargewichtsstandards. Die Herstellung der Gele sowie die anschließende Elektrophorese wurden mit dem Mini-Gelsystem der Firma Biorad durchgeführt. Es wurde ein Gel bestehend aus Trenn- und Sammelgel nach dem folgenden Rezept hergestellt.

Lösung	Trenngel 15%	Trenngel 18%	Sammelgel 6%
ddH ₂ O	2.4 ml	1.1 ml	1.35 ml
Trenngelpuffer	2.5 ml	3.9 ml	
Sammelgelpuffer			0.625 ml
30% (w/v) Acrylamid	5 ml	9 ml	25 µl
10% SDS	0.1 ml	157 µl	25 µl
TEMED	5 µl	4.7 µl	1.25 µl
APS	50 µl	157 µl	12.5 µl

Dabei wurde zunächst das Trenngel und nach erfolgter Polymerisation von diesem das Sammelgel unter der Verwendung eines Gelkammes gegossen. Die Proteinproben wurden mit 2x Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min aufgekocht und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V. Das Gel wurde nach erfolgter Auftrennung mit Färbelösung gefärbt und wieder teilweise entfärbt, wobei der Farbstoff nur an Proteinen gebunden bleibt.

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
1% (w/v) SDS

10x Laufpuffer
250 mM Tris-HCl
2 M Glycin

Probenpuffer
62.5 mM Tris-HCl
25% Glycerin
2% SDS
0.01% Bromphenolblau
10% β-Mercapthoethanol

Coomassie Färbelösung
0,1% (w/v) Coomassie R250
40% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung
10% (v/v) Ethanol
5% (v/v) Essigsäure

3.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach dem von Bradford entwickeltem Verfahren. Bei diesem wird der Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau verwendet, der mit den Seitenketten von Arginin, Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin interagiert, wobei die Wechselwirkung mit Arginin am wichtigsten ist. Durch die Bindung an die Proteine wird der Farbstoff in seiner sauren anionischen Form stabilisiert, dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Coomassie Brilliantblaus von 465 nm zu 595 nm. In der ungebundenen Form liegt der Farbstoff in seiner kationischen Form vor, die bei 465 nm absorbiert. Für die Messung wurde der BIO-RAD Protein Assay (BIO-RAD) verwendet. Es wurde ein 1 ml Ansatz bestehend aus 200 µl Bradford Reagenz, (800-x) µl Wasser und x µl Protein angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration konnte anhand einer vorher erstellten Eichgerade bestimmt werden.

Eine weitere Methode war die Bestimmung der Konzentration über die UV-Absorption bei A_{280} , wobei die Eigenschaft aromatischer Aminosäuren, bei 280 nm zu absorbieren, genutzt wird. Dazu werden die Proteine mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid vollständig denaturiert.

Zur Berechnung dient folgende Formel:

$$c = \frac{Absorption \cdot 100}{\epsilon} \cdot MW$$

c: Konzentration in $g\ l^{-1}$, ϵ : Extinktionskoeffizient in $M^{-1}cm^{-1}$, MW: Molekulargewicht in $mol\ l^{-1}$, wobei der Extinktionskoeffizient durch Eingabe der Proteinsequenz in das Onlineprogramm ProtParam berechnet wurde.

3.3.8 Konzentrierung der Proteine

Proteinlösungen wurden mit Ultrafiltrationseinheiten der Firma Amicon konzentriert. Diese Ultrafiltrationseinheiten besitzen Membranen mit Poren definierter Größe. Lösungen, niedermolekulare Bestandteile und Proteine, die kleiner als die Poren sind, passieren diese bei Zentrifugation. Das Protein kann jedoch die Poren nicht durchdringen und reichert sich in der Lösung über der Membran an. Die Ultrafiltrationseinheiten wurden maximal mit 4000 g bei 4°C bis zum Erreichen der gewünschten Proteinkonzentration durch Volumenverringern zentrifugiert.

3.3.9 Klonierung und Reinigung der rekombinanten Proteine

Die in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten Proteine (Hexim1, CycT1, Tat, CycT1-Tat Fusionsprotein, FHOD1) wurden meist in pGEX-Vektoren als GST-Fusionsprotein oder in pProEx-Vektoren als Protein mit Histidinanker kloniert und exprimiert. Verschiedene Konstrukte der entsprechenden Domänen wurden nach Expressionsverhalten, Stabilität und Löslichkeit getestet. Nach Optimierung der Expressions- und Reinigungsbedingungen wurde entschieden, welche Konstrukte für die biochemischen oder strukturbiologischen Versuche am besten geeignet erschienen. Typischerweise wurde der Affinitätsanker durch tev-Protease-Verdau entfernt, die Proteine in geeigneten Puffern aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Reinheit jeder Präparation wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

3.3.10 GST-pulldown Experimente

GST-pulldown-Experimente sind Bindungsuntersuchungen, bei denen ein Bindungspartner als GST-Fusionsprotein an GSH-beads immobilisiert wurde und durch Inkubation mit Proteinlösungen Bindungspartner detektiert werden können. Zur Herstellung der mit Protein beladenen Sepharosebeads wurden die Proteine zunächst als GST-Fusionsproteine bei den für sie optimalen Bedingungen in einem Volumen von 500 ml exprimiert und nach Ernte und Resuspendierung in 20 ml PBS mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0,5% Tween20 erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 4°C. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min geklärt. Der klare Überstand wurde dann mit der äquilibrierten Sepharoselösung versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert. Zum Pelletieren der beads wurde die Lösung 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die beads dreimal mit PBS gewaschen. Die so präparierten beads wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Bindungsanalysen wurden in einem Volumen von 500 µl durchgeführt. Hierzu wurden ca. 2 µg der GST-Protein-beads eingesetzt und mit 0,5 -1 nmol des jeweiligen anderen Proteins versetzt. Die Ansätze wurden 2-3 h bei 4°C oder 0,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die beads wurden drei- bis fünfmal mit Puffer gewaschen, in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

3.3.11 Immundetektion von Proteinen (western blotting)

Der spezifische Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde mit der Methode des western blottings durchgeführt. Der Blotvorgang schloss sich direkt an die SDS-Gelelektrophorese unter Verwendung des Fast-Blot-Systems von Biometra an. Vier Stücke Whatman Papier wurden in Transferpuffer (3.03 g/l Tris, 11.2 g/l Glycin, 10% Methanol) eingeweicht, die PVDF Membran wurde 5 min in Methanol inkubiert. Der Zusammenbau des Blots auf der Fast-Blot Platte folgte einem Sandwichansatz. Auf der Anodenseite der Apparatur wurden von unten nach oben, 2 Stücke Whatman Papier, die PVDF Membran, das SDS-Gel und abschließend wieder 2 Stücke Whatman Papier aufgeschichtet. Der Blotvorgang wurde bei einer Stromstärke von 243 mA pro Gel für 30 min durchgeführt. Es folgte ein dreimal fünfzehnminütiges Waschen der Membran mit PBS - 0.5% Tween (PBS-T) und anschließend die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in 5% Milchpulver PBS-T Lösung. Das Blockieren konnte über Nacht bei 4°C oder alternativ 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Membran wurde drei mal für fünfzehn Minuten mit PBS-T gewaschen und mit dem primären Antikörper in 5% Milchpulver PBS-T Lösung inkubiert. Nach drei zehnmminütigen Waschschrritten mit PBS-T erfolgte eine Stunde die Inkubation mit dem Sekundäantikörper in 5% Milchpulver PBS-T Lösung. Die Detektion mit dem ECL Detection System wurde nach drei zehnmminütigen Waschschrritten mit PBS-T nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.12 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit 1,5-IAEDANS

Für die Fluoreszenzspektroskopie wurde in dieser Arbeit das Hexim1 Protein (255-359) an einem eingeführten Cystein (G257C) mit dem Fluorophor 1,5-IAEDANS (Molecular Probes) markiert. Dieses umgebungssensitive Fluorophor hat ein Exzitationsmaximum bei 336 nm und Emissionsmaximum bei 490 nm. 50 μM Protein wurden zur Reduzierung der Thiolgruppe 30 min lang mit einem zweifachen Überschuss an TCEP inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung mit einem zehnfachen Überschuss an 1,5-IAEDANS in Standardpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4 und 150 mM NaCl) über Nacht bei 4°C unter anaeroben Bedingungen (Argonschutzgasüberschichtung) inkubiert. Nicht gebundenes 1,5-IAEDANS wurde durch Ausschlusschromatographie entfernt und die Vollständigkeit der Markierung durch MALDI-MS oder ESI-MS kontrolliert.

3.3.13 Elektrophoretischer Gelverschiebungstest (EMSA)

Die Methode des elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstests (electrophoretic mobility shift assay) beruht auf dem unterschiedlichen Migrationsverhalten von RNA-Proteinkomplexen im Gegensatz zu freier RNA in einer nichtdenaturierenden Elektrophorese. Aufgrund dieser Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit der RNA bei Proteinbindung, wird diese Methode auch als Gelverschiebungs- bzw. Gelretardationstest bezeichnet. In dieser Arbeit sollte die Bindung des Fusionsproteins CycT1-Tat an TAR RNA gezeigt werden. Bei der eingesetzten RNA handelte es sich um das TAR Fragment des EIA-Virus. Die RNA wurde mit dem T7 Promotorsystem durch Transkription mit der T7-RNA Polymerase von einem antisense Oligonukleotid generiert und über denaturierende Acrylamidgele (50 mM TBE, 20% Acrylamid, 7 M Harnstoff) gereinigt. Die Konzentration der RNA wurde zwischen 200 und 400 μM eingestellt. Für die Untersuchung der Bindung von Tat an TAR wurde die RNA Konzentration mit 2 μM pro Ansatz konstant gehalten. Die Proteinkonzentration wurde typischerweise von 1 μM bis 8 μM variiert. Das fehlende Volumen auf 10 μl wurde mit Tat/TAR Bindepuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 70 mM KCl, 5.5 mM MgCl₂) aufgefüllt. Die Ansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 2 μl (1/5 Volumen) 6x Probenpuffer (50% Glycerin, 0.042% Bromphenolblau) auf ein 5% natives Polyacrylamidgel, welches schon 15 min auf Eis vorgelaufen war, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte ebenfalls auf Eis bei einer konstanten Stromstärke von 17 mA. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und nach kurzem Waschen mit Wasser erfolgte die unmittelbare Visualisierung der RNA mit UV-Licht. Durch Zugabe ansteigender Mengen an CycT1-Tat sollte eine Sättigung der eingesetzten TAR RNA Menge erreicht werden, um die notwendigen Mengen zur Einstellung eines molaren 1:1 Verhältnisses zu bestimmen. Bei der Durchführung der Versuche wurden nur RNase freie Chemikalien eingesetzt, sowie spezielle Pipetten, Spitzen und Reaktionsgefäße verwendet, um Kontamination mit RNAsen zu verhindern.

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 Gleichgewichts-Fluoreszenztitration

Die Methode der Gleichgewichtsfluoreszenztitration wurde zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d eingesetzt. Gemessen wird die Fluoreszenzänderung nach Titration eines unmarkierten Liganden zu einem Fluoreszenz-markierten Protein. Voraussetzung ist, dass ein Protein selektiv an einer Position markiert werden kann und die Bindung des Liganden Änderungen in der Fluoreszenz hervorruft, was durch Änderung der chemischen Umgebung des Fluorophors induziert wird. Die Messungen wurden an einem SPEX FluoroMax III Spektrofluorometer (JobinYvon, Longjumeau, France) bei einer Temperatur von 25°C und unter konstanter Durchmischung durchgeführt. Hierzu wurde in einer speziellen Fluoreszenzküvette (Suprasil, Hellma) G257C-EDANS markiertes Hexim1 (255-359) vorgelegt und zunächst Exzitations und Emissionsspektren bei 490 nm bzw. 337 nm aufgenommen. Für das Exzitationspektrum wurde eine Schlitzbreite von ± 0.5 nm und für das Emissionsspektrum eine Schlitzbreite von ± 7.5 nm verwendet. Erhielt man bei diesen Einstellungen ein im Messbereich des Detektors liegendes Signal (500000 - 1 Mio cps), so wurde die Zeitmessung gestartet und ansteigende Mengen CycT1 zur Lösung stufenweise hinzutitriert. Dabei erfolgte eine erneute Zugabe jeweils erst, nachdem sich ein konstantes Fluoreszenzsignal eingestellt hatte. Der verwendete Puffer wurde zuvor sterilfiltriert und entgast, um Störungen des Fluoreszenzsignals zu verhindern. Nach beendeter Titration erfolgte nochmals die Aufnahme von einem Emissions- und Exzitationspektrum. Die Fluoreszenzänderungen wurden um die Konzentrationsänderung durch Volumenzunahme korrigiert und gegen die molare CycT1-Konzentration aufgetragen. Zur Auswertung der Fluoreszenztitration wurde das Programm Origin 7.0 eingesetzt.

3.4.2 Transiente Fluoreszenzmessungen (stopped flow)

Die Bestimmung von Assoziations- und Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten (k_{on} und k_{off}) erfolgte mit einer SX.18MV stopped flow Apparatur (Applied Photophysics), welche die zeitaufgelöste Analyse von Fluoreszenzsignalen im Millisekundenbereich ermöglicht und somit für die Messung schneller Reaktionskinetiken geeignet ist. Die zu mischenden Reaktanden befinden sich in zwei separaten Vorratsspritzen. Durch einen Druckluftimpuls (3-4 bar) auf die Spritzenstempel werden gleiche Anteile der Reaktionspartner sehr schnell in die Mischkammer injiziert, wo eine homogene Vermischung stattfindet. Anschliessend gelangt die Reaktionslösung in die eigentliche Messzelle, dessen verdrängtes Volumen in die Stoppspritze gedrückt wird, die vollständig gefüllt den Fluss der Probe stoppt und die Messaufnahme auslöst. Da die Messaufnahme erst beim Erliegen des Probenflusses erfolgt, wird hierdurch die Zeitauflösung der Methode bestimmt und ein Teil der Anfangskinetik geht verloren. Diese Totzeit beträgt hier etwa 5 ms. Die Messungen erfolgten in entgastem Puffer bei 25°C. Das mit 1,5-IAEDANS markierte Hexim1 Protein wurde bei 336 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz durch einen Kantenfilter, der Strahlung nur oberhalb der angegebenen Wellenlänge durchlässt (420 nm), verfolgt. Die Auswertungen erfolgten mit den Programmen Origin 7.0 und Scientist.

3.4.3 Isothermale Titrationskalometrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine sehr sensitive kalorimetrische Methode, mit der die thermodynamischen Parameter einer Reaktion bestimmt werden können. In der Regel geht die Wechselwirkung zweier Proteine mit einem messbaren energetischen Prozess einher, der in Wärmeänderung erfasst wird. Die Wärmeänderung wird in einer Messzelle relativ zu einer Referenzzelle gemessen. Das verwendete "differential power compensation" Kalorimeter enthält eine Mess- und eine Referenzzelle, die über einen Rückkopplungsnetz miteinander in Verbindung stehen und thermisch gegenüber der Außentemperatur isoliert sind. Durch einen variablen kleinen Heizstrom wird die Temperatur der Messzelle an die der Referenzzelle angepasst. Wird nun aus der Spritze ein Reaktionspartner zu dem in der Messzelle befindlichen anderen Partner schrittweise titriert, findet im Falle der Interaktion der Reaktanden ein exothermer bzw. endothermer Prozess statt, der zum Erwärmen bzw. Abkühlen der Messzelle führen würde. Diese Änderung wird vom System detektiert und durch eine Verringerung bzw. Erhöhung des Heizstroms kompensiert. Aus dieser Änderung des Heizstroms kann die Wärmemenge bestimmt werden, die vom System aufgenommen bzw. abgegeben wurde. Die Wärmeänderungen und das Integral der Wärmetönung wird gegen das molare Verhältnis (Injektant/Protein in der Zelle) aufgetragen. Eine direkte Bindung folgt einem sigmoidalen Verlauf, aus dem sich die Assoziationskonstante (K_d), die Stöchiometrie (n), die Änderung der Enthalpie (ΔH) sowie der Entropie (ΔS) der Reaktion bestimmen lassen. Aus diesen Daten kann dann die Änderung der freien Energie (ΔG) über die Gibbs-Funktion berechnet werden.

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

Die Beiträge der Wärmeänderung (ΔH) und der Entropie (ΔS) zur freien Enthalpie (ΔG) können sehr unterschiedlich sein. Die Wärmeänderung setzt sich vor allem aus den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Protein, Ligand und Lösungsmittel zusammen. Dazu zählen die Wasserstoffbrücken, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Proteinen, aber auch strukturelle Änderungen der Solvathülle (Fisher and Singh, 1995). Die ΔS bestimmenden Faktoren sind vielfältiger: durch das Auflösen der Hydrathülle erhöht sich die Entropie, wohingegen durch Komplexbildung dem System freie Partikel entzogen und so dessen Freiheitsgrade verringert werden. Dadurch werden Seitenketten oder Domänen in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, was sich in einer negativen Entropieänderung äußern kann (Jelesarov and Bosshard, 1999). Allgemein werden diese Effekte als Solvatisierungsentropie und Konformationentropie bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde die Dissoziationsreaktion von Proteinen durch Titration in Puffer untersucht. Hierzu wurden das VP-ITC Gerät der Firma MicroCal (Northampton) verwendet. Das Volumen der Messzelle betrug 1.419 ml und das der Spritze 250 μ l. Die Lösung in der Spritze wurde in 8 μ l Schritten injiziert. Vor der Messung wurden die Proben steril filtriert und vollständig entgast. Die Proteinlösung wurde in die Spritze des Gerätes gefüllt und in Puffer (20 mM Tris-HCl [pH 7,4], 50 mM NaCl) titriert. Um Puffereffekte auszuschließen, wurde das Protein in dem gleichem Puffer gelöst, der auch für die Messung eingesetzt wurde. Die eingestellte Temperatur betrug 25°C. Die Anpassung einer Dissoziationskurve an die Messdaten erfolgte mit dem Programm VP-ITC Origin 7.0.

3.4.4 Massenspektrometrie

Die Massenanalyse von Proteinen wurde mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt, wobei sich beide Verfahren im Ionisationsprinzip unterscheiden.

MALDI-TOF-MS: Die Ionisation einer Probe erfolgte über eine Matrix, in die das Protein eingebettet wird. Hierfür wurde ein Flugzeitmassenspektrometer (Voyager, Applied Biosystem) verwendet. Als Matrix diente Sinapinische Säure, die für die Untersuchung von Proteinen geeignet ist. Für das Anfertigen der Matrix wurde die Sinapinische Säure in einer Lösung aus gleichen Anteilen Acetonitril und ddH₂O mit 0,1% TFA aufgenommen, kurz vermischt und abzentrifugiert. Je 1 µl des unverdünnten Proteins und zweier Verdünnungen wurden auf die Vertiefungen einer Maldi Platte pipettiert und mit 1 µl der Matrix vermischt. Nach Kokristallisation der Proteine mit der Matrix konnten die Proben gemessen werden. Das Matrix-Protein-Gemisch wird einem Laserimpuls ausgesetzt, der von der Matrix absorbiert wird und zur Desorption und Ionisation des Gemischs führt. Die auftretenden Molekül-Ionen werden anschließend in einem elektrischen Feld im Hochvakuum beschleunigt und durch Flugzeitanalyse (TOF = time of flight) das m/z Verhältnis bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch die Voyager Software.

ESI-MS: Diese Methode ist im Gegensatz zum MALDI-MS sensitiver, jedoch auch gegenüber Salz in der Probe empfindlicher. Daher wurde die Probe vor der Messung durch eine C₄-Säule entsalzt. Die Ionisation der Probe erfolgt hier über das Einsprühen der Probe in eine Kammer mit hohem elektrischem Potential. Die entstehende Dispersion der Flüssigkeit führt zu vielen kleinen geladenen Tröpfchen, in denen nach Verdunsten des Lösungsmittels protonierte Proteine in der Gasphase entstehen. Die Analyse der Proteinfragmente erfolgte mit der Ionenfalle und zur Auswertung diente das Programm MagTran.

3.4.5 Analytische Größenausschlusschromatographie

Die analytische Größenausschlusschromatographie ist eine Methode zur Größenbestimmung von Proteinen. Die Proteine werden anhand ihrer Stokeschen Radien getrennt. Der Unterschied zur präparativen Größenausschlusschromatographie liegt in der Menge des einzusetzenden Proteins. Das Säulenvolumen betrug ca. 30 ml. Die Experimente wurden an dem Computer-gestützten HPLC System der Marke Waters 626 LC (Waters, MA) durchgeführt. Die Säule wurde zunächst mit dem Laufpuffer äquilibriert, anschließend erfolgte das Auftragen der Proteine unter Verwendung eines automatischen Injektionssystems. Die Elution der Proben erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min. Mittels eines Zwei-Kanal-Absorptionsdetektors wurde das Absorptionsvolumen bestimmt und mit einem Proteinstandard (BioRad) korreliert, wobei die Masse eines entsprechenden globulären Proteins berechnet wird. Dazu wurden die Elutionsvolumen der Standardproteine sowie das Ausschlussvolumen und das Totalvolumen gemessen und aus diesen der K_{AV} -Wert für die jeweilige Säule ermittelt. Bei Auftragung der K_{AV} Werte gegen den Logarithmus der Molekularmasse ergibt sich unter der Annahme globulärer Proteine ein linearer Zusammenhang.

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0} \text{ mit } V_e: \text{ Elutionsvolumen, } V_0: \text{ Ausschlussvolumen, } V_T: \text{ Totalvolumen.}$$

3.5 Röntgenkristallographische Methoden

3.5.1 Proteinkristallisation

Molekulare Substanzen ordnen sich unter bestimmten Bedingungen zu einer geordneten, periodischen Gitterstruktur an. Diese werden als Kristalle bezeichnet und können verwendet werden, um durch Diffraktionsexperimente die dreidimensionale Struktur der kristallinen Substanz mit im Idealfall atomarer Auflösung zu bestimmen. In der Proteinkristallisation wird versucht, ein in wässriger Lösung befindliches Protein durch eine langsame, kontrollierte Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung in den kristallinen Zustand zu überführen. Das wasserlösliche Polymer PEG ist ein häufig verwendetes Fällungsmittel mit sehr geringer denaturierender Wirkung. Neben der Konzentration und der Art des verwendeten Fällungsmittels sind Proteinkonzentration, Temperatur und der pH Wert wichtige Parameter. Oft ist auch die Zugabe geringer Mengen von speziellen Chemikalien („Additive“) ausschlaggebend, die mit dem Protein interagieren. Die Aufklärung der Struktur eines Proteins anhand eines Beugungsmusters erfordert Kristalle von hoher Qualität, was gleichbedeutend mit einer hohen Symmetrie ist. Das macht in vielen Fällen eine umfassende Optimierung der Kristallisationsbedingungen notwendig.

Die Kristallisation der verschiedenen heterolog exprimierten, N-terminalen FHOD1 Konstrukte wurde einleitend mit high throughput screens (Hampton Research und Qiagen) durchgeführt, um mögliche Kristallisationsbedingungen zu identifizieren. Dazu werden 96er-Kristallisationsplatten (Greiner) und der Roboter Mosquito Crystal (Tip Labtech) mit einem Reservoirvolumen von 60 μ l und einem Tropfenvolumen von 200 nl (Protein + Puffer) eingesetzt. Die Ansätze werden fortlaufend auf Kristallbildung kontrolliert. Initialen Kristalle des Konstrukts FHOD1-U (1-377) wurden mit einer Hochsalzbedingung gefunden (4 M NaCl) und in 24-well Platten mit 1-2 μ l Tropfengröße mit der hanging drop Methode reproduziert. Um die Kristalle zu vergrößern und zu vereinzeln, was für die spätere Datensammlung notwendig ist, wurde die seeding Methode angewandt. Bereits gewachsene Kristallbruchstücke werden in neue Tropfen mit leicht veränderten Pufferbedingungen überführt und dienen dort als Nukleierungskeime für neue Kristalle. Für die Datenaufnahme unter cryo-Bedingungen müssen die gewachsenen Kristalle in flüssigem Stickstoff in einer Öse schockgefroren werden. Um eine Schädigung des Kristalls durch die sprunghafte Veränderung des umgebenden Puffers zu vermeiden, ist es meist vorteilhaft, den Kristall in einem bestimmten Cryopuffer zu frieren. Bei der Verwendung von 4 M NaCl als Präzipitant konnten die Kristalle auch direkt gefroren werden. Diese Kristalle zeigten aber mit Synchrotronstrahlung ein Beugungsmuster nur bis zu einer Auflösung von 4 Å, welches für die atomare Strukturbestimmung nicht ausreichend ist. Deshalb wurde ein neues Screening durchgeführt, in dem mit einem anderen Proteinkonstrukt FHOD1-U1 (1-339) eine andere Kristallisationsbedingung gefunden wurde (PEG 400), in der die Kristalle ohne Cryolösung gefroren werden konnten. Diese Kristalle zeigten eine Diffraktion bis zu 3 Å, hatten aber die Form dünner Kristallplättchen, die sich im Röntgenstrahl anisotrop verhielten. Deshalb wurden am institutseigenen Generator viele Kristalle getestet, um Kristalle mit möglichst geringer Anisotropie zu identifizieren. Zur Bestimmung der Phasen des Beugungsmusters waren Selenomethionin-Kristalle notwendig. Auf die Methode der Schwermetall-derivate konnte nicht zurückgegriffen werden, denn die Kristalle zeigten sehr schnell Instabilitäten.

Das Selenomethionprotein kristallisierte unter den gleichen Bedingungen und nach intensivem Screening am institutseigenen Generator (Rigaku MAR Generator) wurde ein Kristall gefunden, der vollständige Daten bis 2.7 Å lieferte.

3.5.2 Datenaufnahme, Modellbau und Verfeinerung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Synchrotronmessungen wurden am SLS (Swiss Light Source) in Villigen, Schweiz, durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte unter Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung an den beamlines X10SA und X06SA. Ein vollständiger Datensatz für einen nativen Kristall und ein anderer für einen Selenomethioninkristall wurden aufgenommen, deren Datenstatistiken in Tabelle 3 aufgelistet sind.

Zur Datenprozessierung wurde das Programmpaket XDS (Kabsch, 1993) verwendet. Durch die sich während der Messung ändernden experimentellen Bedingungen (schwankende Intensität des Röntgenstrahls, Strahlenschäden am Kristall, Anisotropie des Kristalls, etc.) wird eine interne Skalierung der Intensitäten nötig. Dies wurde mit dem im Programmpaket vorhandenen Programm XSCALE durchgeführt. Beide gemessenen FHOD-U1 Kristalle gehören der Raumgruppe P1 an. Verschiedene Phasierungsprogramme können aus den gemessenen anomalen Differenzen mittels Pattersonmethode die Positionen anomaler Streuer berechnen. SHELX-D (Sheldrick, 1998) wurde zum Auffinden der Se-Positionen verwendet und anschließend mit dem Programm CNS (Brunger et al., 1998) phasiert. Die Phasenbestimmung erfolgte mit der Methode des multiwavelength anomalous diffraction (MAD) phasing, deren Vorteil ist, dass alle Datensätze am gleichen Kristall gemessen werden können und nur ein Derivat für die Phasenbestimmung nötig ist, so dass in der Regel keine Non-Isomorphie entsteht. Zusätzlich können Selen-Atome als anomale Streuer sehr einfach als Selenomethionin inkorporiert werden, was zudem den Vorteil hat, dass beim anschließenden Modellbau an den Selenomethionin-Positionen mit dem Bau des Modells begonnen werden kann.

Aus den gewonnenen MAD-Phasen lässt sich eine initiale Elektronendichte berechnen und darstellen. Ein großer Teil der Aminosäurekette wurde mit dem Programm CNS automatisch eingebaut, nachdem die erhaltenen Phasen interpretierbar waren. Für den manuellen Einbau fehlender Bereiche wurde das Graphikprogramm O (Jones et al., 1991) verwendet. Da sowohl die Elektronendichtekarten als auch die initial erhaltenen Modelle noch mit Fehlern behaftet waren, wurden sie in einer zyklischen Prozedur abwechselnd manuell verändert und verfeinert. Die aus den Positionen der Selenatome erhaltenen Phaseninformationen wurden mit Hilfe des Programms CNS verbessert. Dabei wurde in einem iterativen Prozess eine Dichtemodifikation (density-modification) durchgeführt. Die Statistik des Refinements ist ebenso in Tabelle 3 aufgeführt. Wassermoleküle wurden teilweise mit dem Programm CNS automatisch in das Proteinmodell eingebaut und teilweise manuell mit dem Programm O. Die Molekülgeometrien wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) analysiert. Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurde das Programm PYMOL (DeLano, 2002) benutzt. Darstellungen der elektrostatischen Potentiale auf Moleküloberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1993) berechnet und in PYMOL dargestellt.

4 Ergebnisse

I. Untersuchungen zur Interaktion von Hexim1 und Cyclin T1

Zuerst werden in diesem Kapitel die Studien zur Interaktion des humanen Hexim1 Proteins mit Cyclin T1 (CycT1) vorgestellt. Die molekularen Interaktionen im inhibitorischen Komplex aus P-TEFb, Hexim1 und 7SK snRNA sind erst unvollständig aufgeklärt. Bei der Entdeckung von Hexim1 wurde beschrieben, dass die Interaktion zu 7SK snRNA über ein Arginin-Cluster, das als Motiv in vielen RNA-bindenden Proteinen existiert, erfolgt (Michels et al., 2004). In dieser Arbeit sollte die Bindungsdomäne in Hexim1 für CycT1 identifiziert und die Interaktion biochemisch charakterisiert werden. Bekannt war, dass CycT1 über seine N-terminalen Cyclinboxen (1-281) die Interaktion im inhibitorischen Komplex vollzieht (Michels et al., 2003; Yik et al., 2003). Die inhibitorische Wirkung dieser Interaktion sollte zusätzlich *in vivo* geklärt werden.

4.1 Darstellung der Hexim1 Proteinkonstrukte

Da die Funktion des Hexim1 Proteins als Transkriptioninhibitor erst im Jahre 2003 entdeckt und somit zu Beginn dieser Studie kaum Ergebnisse über den Domänenaufbau des Proteins vorlagen, bestand die Aufgabe dieser Arbeit zuerst darin, die modulare Domänenarchitektur zu analysieren. Das 41 kDa große humane Hexim1 Protein (accession number BAA36166) wurde zuerst mit computergestützten Methoden hinsichtlich seines Aufbaus der modularen Domänenarchitektur und der Sekundärstrukturelemente untersucht (Abb. 10). In der SMART, PFam, Prosite und AnDom Analyse wurden keine bekannten funktionalen oder strukturellen Proteindomänen erkannt. Es wurde ein zweigeteiltes nukleares Lokalisationssignal (NLS) gefunden, was ebenfalls durch zellbiologische Daten bestätigt wurde (Barboric and Peterlin, 2005; Michels et al., 2003; Yik et al., 2004). Desweiteren wurde eine C-terminale „coiled coil“ Region vorgeschlagen. Insgesamt hat das Protein einen starken hydrophilen Charakter mit 125 geladenen von 359 Aminosäuren (35%, Abb. 10B). Durchschnittlich haben nichttransmembrane Proteine einen Anteil von 23% an geladenen Aminosäuren. In Hexim1 sind die Ladungen relativ homogen im Protein verteilt und akkumulieren nur in einem positiv geladenen Cluster, das auch das NLS beherbergt. Weiter C-terminal liegen zwei hochkonservierte, negative Bereiche von etwa 40 Aminosäuren Länge (Abb. 10A). Hydrophobe Reste (L, I, V, M und F) liegen gleichmäßig verteilt über das gesamte Protein (Abb. 10B), wohingegen Proline überdurchschnittlich häufig im N-Terminus vorkommen, was als Indiz für einen nichtstrukturierten Bereich gewertet werden kann. Übereinstimmend damit wird in Sekundärstrukturvorhersagen (Abb. 10C) nur ein kleiner Anteil an strukturierten Bereichen gefunden, während große Segmente, die insbesondere im N-Terminus liegen, ungefalteter sein sollen. Diese Annahme wird durch das Vorhandensein von Resten wie E (13%), P (9.6%), S (7.5%) und K (7.1%) im N-

terminalen Bereich (1-254) gestützt, da diese Aminosäuren auf intrinsisch ungefaltete Proteindomänen hindeuten (Tompa, 2002).

Da für Hexim1 eine coiled coil Region von Position 260 bis 350 postuliert wurde und basierend auf der Annahme, dass die Bindungsfläche in einer strukturierten Region des Proteins liegen sollte, wurden für die biochemischen Analysen zum Domänenaufbau in Hexim1 zwei C-terminale Konstrukte (255-359) und (266-359) generiert. Daneben wurde ein N-terminales Konstrukt (1-254) und volllängen Hexim1 (1-359) über ein Histidin-Epitop gereinigt, um alle Bereiche in Hexim1 auf CycT1 Bindung untersuchen zu können. Die beiden C-terminalen Hexim1 Fragmente schienen stabil, gut löslich und konnten mit hoher Ausbeute gereinigt werden (ca. 20 mg gereinigtes Protein aus 1L *E. coli* Kultur). Jedoch waren das volllängen Protein und das Fragment (1-254) weniger stabil und degradierten während des Reinigungsprozesses. Interessanterweise wies das native 41 kDa große Hexim1 Protein im SDS Gel eine Größe von 70 kDa auf. Ähnliche Eigenschaften zeigte das N-terminale Fragment, das mit einer tatsächlichen Größe von 28 kDa bei einer scheinbaren Größe von 50 kDa migrierte. Die C-terminalen Konstrukte dagegen zeigen im SDS Gel ihre tatsächliche Größe von 11.4 und 12.5 kDa (Abb. 11, Spuren 3, 6, 9, 12). Das Laufverhalten im SDS Gel könnte ein Indiz für N-terminale ungefaltete Regionen und eine C-terminale, strukturierte Domäne sein. Möglicherweise bildet das N-terminale Protein auch eine dimere Struktur, die auch durch SDS Zugabe nicht aufgebrochen wird.

Daneben wurden zwei N-terminale Konstrukte von CycT1 (1-272) und (1-292) als GST-Fusionsproteine generiert, die als stabile Proteine mit einer Ausbeute von 10 mg/l *E. coli* Kultur gereinigt werden konnten und in Abbildung 11 in der input Bande dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine wurden routinemäßig mit MALDI-MS bestimmt (Tabelle 1). Die Klonierung, Expression und Reinigung der Hexim1 und CycT1 Fragmente wurde im Methodenteil beschrieben.

Konstrukt	berechnete Masse (Da)	gemessene Masse mit MALDI-MS (Da)
Hexim1 (1-254)	28122.5	28180.3
Hexim1 (255-359)	12791.1	12827.4
Hexim1 (266-359)	11340.6	11281.5
Cyclin T1 (1-272)	31789.4	31670.7
Cyclin T1 (1-292)	33663.3	33701.3

Tabelle 1: Kalkulierte Molekularmassen der Hexim1- und Cyclin T1-Konstrukte. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe des Onlineprogramms ProtParam (<http://us.expasy.org>) berechnet.

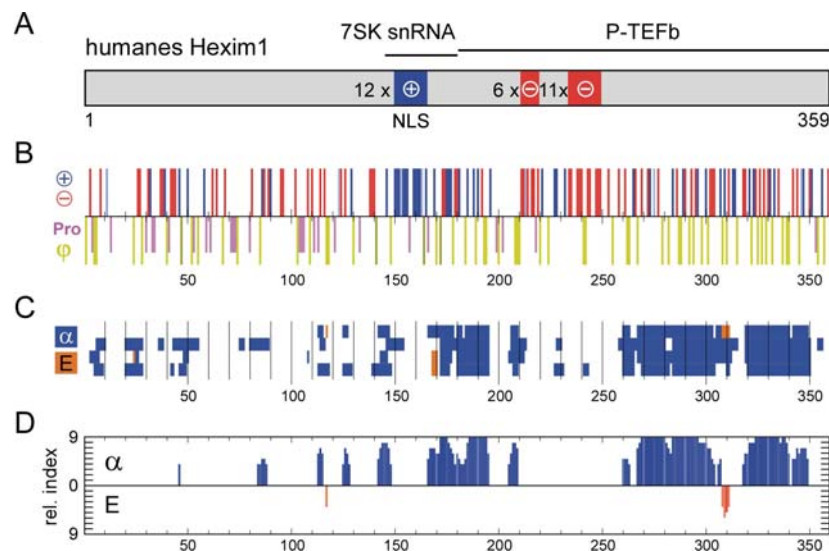


Abbildung 10: Sequenzbeschreibung und Sekundärstrukturanalyse des humanen Hexim1 Proteins. (A) Balkendiagramm der Sequenzmotive und bisher bekannten Interaktionsstellen für 7SK RNA und P-TEFb. (B) Aminosäureanalyse des humanen Hexim1. Negativ geladene Aminosäuren wie D und E sind rot gekennzeichnet und positiv geladene Reste blau (R und K) oder hellblau (H). Große hydrophobe Reste wie L, I, V, M und F, sowie P sind im unteren Bereich jeweils gelb und magenta aufgezeigt. (C) Sekundärstrukturvorhersagen aus vier verschiedenen unabhängigen Analysen. Vorhersagen für eine α -helikale Faltung oder β -Stränge (E = extended) sind jeweils blau und orange gekennzeichnet. Die vier Analysen stammen aus den Programmen PHD (oberste Reihe), PSIPRED (zweite Reihe), SAM-T99 (dritte Reihe) und SSPRO (unterste Reihe). (D) Balkendiagramm des Verlässlichkeitsindex der in PHD vorhergesagten Sekundärstrukturelemente. Die relativen Wahrscheinlichkeiten von (0.1 bis 1) wurden auf einer Skala von 0 bis 9 dargestellt, wobei nur Werte ≥ 4 gezeigt sind. Die Farbkodierung wurde wie in C gesetzt.

4.2 Identifizierung der Cyclin T1 Bindungsdomäne in Hexim1

Die direkte Bindung von Hexim1 an Cyclin T1 wurde zunächst mit GST „pulldown“ Experimenten untersucht. Dabei wurde ein GST-CycT1 Fragment (1-292), das an GSH-beads immobilisiert war, eingesetzt. In pulldown Experimenten mit volllängen Hexim1 sowie den beiden C-terminalen Hexim1 Fragmenten konnte direkte Bindung gezeigt werden. Natives Hexim1 (1-359) und die Fragmente (255-359) und (266-359) kopräzipitierten mit GST-CycT1, das an GSH-beads gekoppelt ist (Spur 2,5 und 8). Das N-terminale Fragment hingegen zeigte keine Bindung an die Cyclin-Boxen von CycT1 (Abb. 11, Spuren 2, 5, 8, 11). Die Kontrolle mit GST Protein ohne CycT1 wies ebenfalls keine Bindung auf (Abb. 11, Spuren 1, 4, 7, 10). Da das zehnte Aminosäuren längere C-terminale Fragment (255-359) im Vergleich zu dem Konstrukt (266-359) etwas stabiler war und leicht höhere Ausbeuten ergab, wurde diese Domäne als Cyclin T-bindende Domäne (TBD) identifiziert.

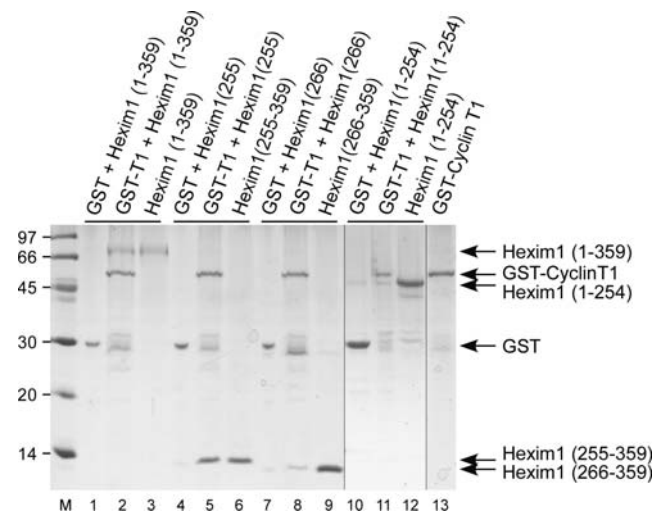


Abbildung 11: Eine 12kDa große C-terminale Domäne von Hexim1 bindet Cyclin T1. *In vitro* pull-down Experimente mit GST-CycT1 (1-292) und volllängen Hexim1 oder verschiedenen im Text angegebenen Hexim1 Fragmenten identifizieren eine C-terminale Domäne, die für die Interaktion notwendig ist. Im SDS Coomassie Gel sind jeweils 2 µg des GST-CycT1 Fusionsproteins aus den Bindungsassays aufgetragen. Die Hexim1 Proteinfragmente sind in Spuren 3, 6, 9 und 12 mit 20% der im Assay eingesetzten Menge dargestellt.

Um die Notwendigkeit der TBD für die Funktionalität des inhibierenden Komplexes zu untersuchen, folgten Studien in HeLa Zellen. Die hier gezeigten *in vivo* Studien wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Matija Peterlin, Department of Medicine der UCSF, von Dr. Matjaz Barboric durchgeführt. Für diese Studien wurden wildtyp Hexim1 und zwei Mutanten als FLAG-Epitop gekennzeichnete Proteine eingesetzt. Die Mutanten besaßen einen verkürzten C-Terminus, was in Konstrukten von (1-314) und (1-286) resultierte. In Immunopräzipitationsassays (Abb. 12A) wurde die Notwendigkeit der TBD für die Bindung an CycT1 *in vivo* gezeigt. Die Vorgehensweise wurde im Methodenteil beschrieben. In transienten Expressionsassays wurden die FLAG markierten Hexim1 Proteine in HeLa Zellen exprimiert und mit anti-FLAG Agarose beads aus dem Zelllysat immunopräzipitiert. Bindung an endogenes P-TEFb wurde über einen Western Blot identifiziert mit Antikörpern, die CycT1 sensitiv waren. Erwartungsgemäß interagiert wildtyp Hexim1 mit CycT1 in Zellen. Ebenso behält die Mutante Hexim1 (1-314) die Fähigkeit der CycT1 Bindung. Die Mutante (1-286) hingegen zeigte keine CycT1 Interaktion. Die Mengen an Hexim1 Proteinen war in allen Versuchsansätzen vergleichbar. Die C-terminale Region von Aminosäure (286–314) ist demnach notwendig für Bindung an CycT1 in Zellen.

Um auf die Frage der Funktionalität einzugehen, wurde die Fähigkeit der drei Fragmente getestet, transkriptionale Aktivität von P-TEFb in Zellen zu inhibieren (Abb. 12B). Dafür wurde ein System mit dem Plasmidreporter pG6TAR eingesetzt, welches ebenfalls im Methodenteil genauer beschrieben ist. Dieses System quantifiziert Transkriptionsaktivierung. Der Plasmidreporter pG6TAR enthält sechs Gal4DNA Bindungsstellen, die aufwärts des HIV-1-LTR positioniert sind, der wiederum das Chloramphenicol Acetyltransferasereporter gen und das Hybridprotein Gal4.CycT1 anschließt.

Die Rekrutierung des Hybridproteins zum pG6TAR Promotor über seine Gal4.DNA Bindungsdomäne aktiviert Transkription. Wird die Gal4.CycT1 Chimäre mit dem pG6TAR Plasmidreporter zusammen in HeLa Zellen exprimiert, erhöht sich die Aktivität 27-fach verglichen mit der basalen Transkriptionsrate. Übereinstimmend mit seiner inhibitorischen Funktion wird durch Zugabe von wildtyp Hexim1 zum Transkriptionsansatz die Transkriptionsrate um das Vierfache reduziert. Die Mutante (1-314) erniedrigte die Transkription in gleicher Weise. Im Gegensatz dazu verliert die Mutante (1-286) ihre inhibitorische Funktion. Die Expressionslevel der transfizierten Proteine waren in allen Ansätzen vergleichbar. Folglich sind die Aminosäuren 286-314 *in vivo* notwendig für die inhibitorische Funktion des Hexim1 Proteins. Werden die *in vivo* Daten zusammengefasst, kann die Aussage gemacht werden, dass Bindung an P-TEFb und Inhibierung der Transkriptionsaktivierung von P-TEFb in Zellen von der Integrität der C-terminalen Domäne in Hexim1 abhängt.

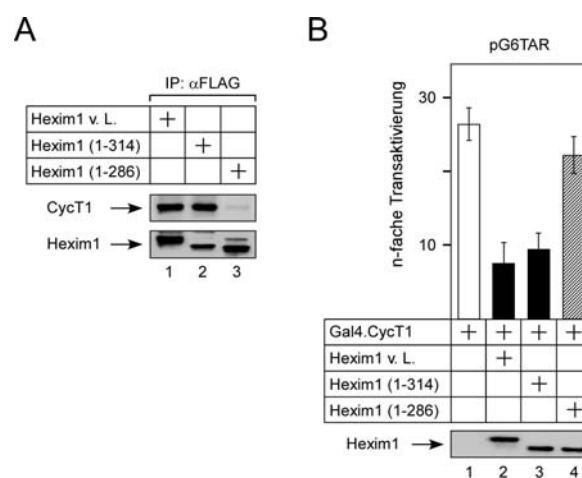


Abbildung 12: Die C-terminale Region (286-314) in Hexim1 ist notwendig für Bindung an P-TEFb und Inhibierung der Transkriptionsaktivierung in Zellen. (A) Deletion der C-terminalen Region in Hexim1 verhindert die Bindung an P-TEFb in Zellen. Hexim1 Proteine, die in HeLa Zellen von den entsprechenden Plasmideffektoren exprimiert (6 µg, Spuren 1-3) und mit anti-FLAG beads immunopräzipitiert wurden, sind oberhalb des Western Blots dargestellt. Die Pfeile an der linken Seite markieren gebundenes P-TEFb und die immunopräzipitierten Hexim1 Fragmente. (B) Deletion der C-terminalen Region in Hexim1 führt zu einem Verlust der inhibitorischen Funktion. In HeLa-Zellen exprimierter Plasmidreporter pG6TAR (0.4 µg, Balken 1-4) ist im Diagramm dargestellt. Proteine, die von den entsprechenden Plasmideffektoren (Gal4.CycT1, 0.6 µg und Hexim1, 0.8 µg) mit dem Plasmidreporter koexprimiert wurden, werden angezeigt. Die n-fache Transaktivierung stellt das Verhältnis zwischen Gal4.CycT1 aktivierter Transkription und der Aktivität des Reporterplasmids allein dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die unterste Reihe zeigt die Expression der FLAG-Hexim1 Proteine.

4.3 Molekulare Dispersion des Hexim1/Cyclin T1 Komplexes

Zur Untersuchung der molekularen Dispersion des CycT1/Hexim1 Komplexes wurde Größenausschlusschromatographie eingesetzt. Dazu wurden mehrere unabhängige Gelfiltrationsexperimente über eine S75 Säule mit unterschiedlichen Proteinpräparationen in Standardpuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 1 mM DTE) durchgeführt und als Größenstandard ein „Low Molecular Weight Standard“ eingesetzt. Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert. In Abb. 13 ist ein typisches Chromatogramm dargestellt. Auffallend ist, dass die TBD mit einem Molekulargewicht von 12.5 kDa nach 19.1 min bei einer Flussrate von 0.5 ml/min eluiert, was einer berechneten

molekularen Masse von 45 kDa entspricht. Das TBD-Elutionsprofil, das genau definiert und einen symmetrischen, scharfen Peak zeigt, spricht entweder für Oligomerbildung des Proteins oder für eine stark ausgestreckte, elliptische Form der TBD. Ähnliche Beobachtungen wurden für volllängen Hexim1 gemacht, welches mit einer tatsächlichen Größe von 43.7 kDa inklusive des Histidinankers fast im Ausschlussvolumen der Säule bei 15.8 min eluiert. Diese Elutionszeit korrespondiert mit einer molaren Masse von 73 kDa. Die Cyclin-Boxen von CycT1 bilden mit einer Masse von 33.7 kDa eine globuläre, helikale Struktur (Taubе et al., 1999). Übereinstimmend damit entspricht die Elutionszeit von 20.5 min mit einer berechneten Masse von 36 kDa einem CycT1 Monomer. Der linke Flügel des Elutionspeaks könnte auf schwache Oligomerisierung von CycT1 hindeuten. Der Komplex aus CycT1 (1-292) und Hexim1-TBD (255-259), der vor dem Auftragen 30 min inkubiert wurde, koeluiert nach 17.7 min. Eine direkte Interaktion der zwei Moleküle ist somit ebenfalls durch analytische Gelfiltration bestätigt. Die Schulter des Elutionspeaks des Komplexes nach 21 min Retentionszeit wird durch einen Überschuss CycT1 gebildet, wohingegen der Peak bei 32.4 min den Polyhistidinanker repräsentiert. Der Histidinanker hat eine Größe von 2.8 kDa und ist eine Verunreinigung der Proteinlösung nach dem Verdau mit der Tev-Protease. Mit der Annahme, der Überschuss CycT1 im Komplex werde durch ein ungleiches Bindungsverhältnis verursacht, kann die Bildung eines heterodimeren 1:2 Komplexes zwischen CycT1 und Hexim1-TBD postuliert werden.

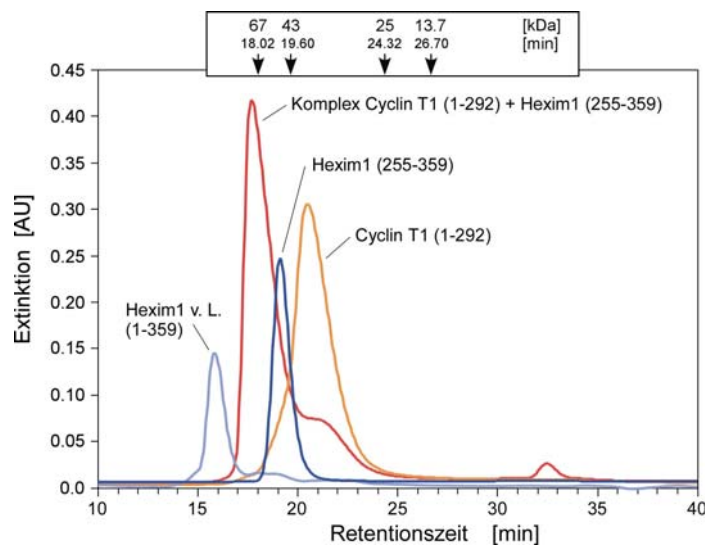


Abbildung 13: Analytische Größenausschlusschromatographie der Komplexbildung zwischen Hexim1 und Cyclin T1. Das Elutionsprofil von volllängen Hexim1, Hexim1 (255-359), CycT1 (1-292) und des Hexim1 (255-359)/CycT1 (1-292) Komplexes sind jeweils hellblau, dunkelblau, orange und rot dargestellt. Die Messungen wurden auf einer Superdex75 (16/60) Säule (0.5 ml/min) durchgeführt. Retentionszeiten (min) und molekulare Massen (kDa) der Standardproteine sind oberhalb des Chromatogramms dargestellt. Die beiden Hexim1-Proteine zeigen eine Retentionszeit, die auf eine Dimerisierung des Proteins hinweist. Der Komplex hingegen hat eine Retentionszeit, die einer Größe von einem CycT1 Molekül im Komplex entspricht.

Um eine mögliche Dimerisierung der TBD näher zu untersuchen, wurden weitere GST pulldown Experimente und isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt (Abb. 14A). Volllängen GST-Hexim1, welches an GSH-beads gekoppelt wurde, präzipitiert effizient unverkürztes Hexim1, sowie

das N-terminale Fragment (1-254). Wird Hexim1-TBD als GST-Fusionsprotein eingesetzt, präzipitieren nur geringe Mengen des gleichen Fragments ohne GST-Anker (Abb. 14A, Spuren 2, 5, 8). Die Experimente weisen einerseits auf eine eher schwache Dimerisierung der TBD hin. Andererseits könnte die Bindung an die TBD ohne GST-Anker aufgrund eines sehr starken GST-TBD Dimers reduziert sein.

ITC kann neben der Bestimmung von Dissoziationskonstanten und thermodynamischen Parametern einer Bindung zur Determinierung des Oligomerisierungszustands einer Proteinlösung eingesetzt werden. Zur Durchführung des ITC Experiments wurde eine 0.5 mM TBD Proteinlösung in Standardpuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl) aus der Spritze schrittweise zu je 8 μ l in die Zelle injiziert, die mit demselben Puffer befüllt war. Die Injektion der TBD in die Messzelle zeigt eine Wärmefreisetzung, die im Verlauf des Experiments exponentiell abnimmt. Die beste Angleichung ergab sich für die gezeigten Messwerte (Abb. 14B) aus einer Dissoziationsreaktion mit einem Stöchiometriefaktor von $n=2$ für den Oligomerisierungszustand des Proteins. Unter der Annahme, dass Hexim1-TBD ein coiled coil Dimer bildet, könnte ein Übergang vom tetrameren Zustand in eine dimere Form auftreten. Eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Multimerisierung $K_d(\text{Multimer}) = 790 \mu\text{M}$ und eine Enthalpie von $\Delta H^0 = -10.4 \text{ kcal/mol}$ wurden berechnet. Das ITC Experiment unterstützt die Annahme, dass die Hexim1-TBD ein schwaches Oligomer ausbildet, möglicherweise ein Tetramer, welches aus stabilen Dimeren aufgebaut ist.

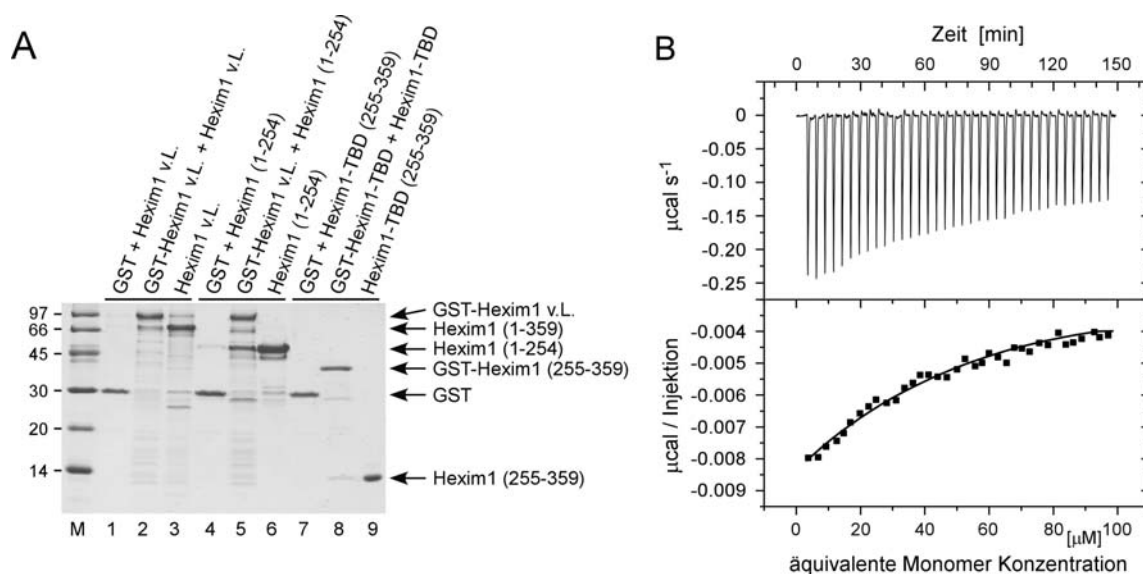


Abbildung 14: Bestimmung des Oligomerisierungszustands des Hexim1 Proteins. (A) GST pulldown Experimente mit volllängen GST-Hexim1 und GST-Hexim1-TBD deuten auf dimere Interaktion mit freiem Hexim1 hin. volllängen Hexim1 und das N-terminale Fragment (1-254) werden mit GST-Hexim1 aus der Lösung kopräzipitiert (Spur 2, 5), wohingegen Hexim1-TBD Homodimere bildet. Die Hexim1 Proteinfragmente sind mit 40% der im Assay eingesetzten Menge dargestellt. **(B)** Isothermale Titrationskalorimetrie Messungen der Dissoziation der multimeren Hexim1-TBD. Die Dissoziation von 500 μM Hexim1-TBD in Puffer wurde durch schrittweises Injizieren von je 8 μl (zuerst einmalig 2 μl) Proteinlösung in die Messzelle, die mit Puffer befüllt ist, analysiert. Nach Integration wurde die Energiemenge in $\mu\text{cal}/\text{Injektion}$ gegen die Konzentration des Heximproteins in der Zelle aufgetragen und durch Anpassung an eine Dissoziationskurve aus den gemessenen Daten die Dissoziationskonstante des Multimers $K_d = 790 \mu\text{M}$ berechnet. Die Enthalpie der Multimerassoziation beträgt $\Delta H^0 = -10.4 \text{ kcal/mol}$.

4.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen Hexim1 und Cyclin T1

Ein nächstes Ziel dieser Studie war es, die Bindungskinetik zwischen Hexim1 und CycT1 zu determinieren. Zu diesem Zweck wurden Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen und stopped flow-Messungen eingesetzt. Fluoreszenztitration ist eine sensitive Methode zur Messung kinetischer Parameter einer Bindung. In beiden Techniken wurde eine Mutante der Hexim1-TBD (G257C, C297S) eingesetzt, die N-terminal mit Iod-acetylaminoethylaminnaphtalen-1-sulfonsäure (IAEDANS) über ein Cystein markiert wurde. Dazu wurde N-terminal an Position 257 ein Cystein eingefügt, an das kovalent der Dansylfarbstoff gebunden wurde (siehe Methodenteil). Ein weiteres natürlich vorkommendes C-terminales Cystein erschien in Sekundärstrukturvorhersagen nicht zugänglich, da es durch ein benachbartes Leucin innerhalb der Interaktionsfläche einer möglichen coiled coil Domäne liegen sollte. Nach Markierungsreaktionen der Mutante G257C wurde über MALDI-MS jedoch eine zweifache Markierung festgestellt. Die Position 297 in der TBD wurde deshalb zu Serin mutiert, um die mögliche Markierung mehrfacher Stellen im Protein zu unterbinden. Die Doppelmutante (G257C, C297S) konnte somit vollständig mit IAEDANS markiert werden, was wiederum durch MALDI-MS nachgewiesen wurde. Die fluoreszenzmarkierte TBD wird im Folgenden als TBD-EDANS bezeichnet. Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum von 0.5 μM TBD-EDANS vor und nach 10 μM CycT1 Zugabe ist in Abb. 15A dargestellt. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von CycT1 betrug im Überschuss ungefähr 30%. Zusätzlich war eine Blauverschiebung des Maximums von 471 nm zu 438 nm Wellenlänge festzustellen. Die Exzitationswellenlänge betrug in allen durchgeführten Fluoreszenzassays 337 nm mit 1 nm Schlitzbreite, was dem Absorptionsmaximum von IAEDANS entspricht. Die Emission wurde zwischen 400 – 500 nm aufgenommen und in Schritten von 1 nm mit einer Integrationszeit von 1 s und 5 nm breiten Schlitzen integriert. Die Spektren wurden bei 20°C in Standardpuffer (20 mM Tris/HCl (pH 7.8), 50 mM NaCl) mit 5% Glycerin durchgeführt. Die Spektren wurden auf das Emissionsmaximum von Hexim1 normalisiert. Das Differenzspektrum ist in der Abb. 15A rot gefärbt und der Bereich der Emissionswellenlänge, der zur Aufnahme der Fluoreszenzänderungen aufgenommen wird, ist schraffiert dargestellt (490 nm \pm 7.5). Durch Markierung am Ende des N-Terminus wurde erreicht, dass der Fluoreszenzmarker sensitiv auf CycT1 Bindung reagierte. In späteren ITC Bindungsexperimenten wurde gezeigt, dass der Fluoreszenzmarker keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften hatte.

Zur Bestimmung der Affinität zwischen CycT1 und Hexim1-TBD wurden in einer Fluoreszenzküvette zu 0.5 μM TBD-EDANS ansteigende Mengen an CycT1 titriert. Die Fluoreszenzintensität wurde nach jedem Titrationsschritt nach Einstellung des Gleichgewichts der CycT1 Bindung an EDANS-TBD aufgenommen. Die gemessenen Werte wurden um den Verdünnungsfaktor korrigiert und auf den Startwert normalisiert. Bei einer Auftragung der normalisierten Fluoreszenzintensität gegen die CycT1 Konzentration wurde aus der Assoziationskurve (Abb. 15B) über eine Kurvenanpassung mit dem Programm Origin eine Bindungsaffinität von $K_d = 2.6 \mu\text{M}$ bestimmt. Dieser Wert im niedrigen μM Bereich beschreibt eine mittlere Bindungsaffinität zwischen den beiden Proteindomänen.

Zur Kontrolle wurde *in vivo* gezeigt, dass die Mutante (G257C, C297S) im volllängen Protein ebenfalls Transkription inhibiert. Hexim1 Proteine wurden in HeLa Zellen exprimiert und mit anti-FLAG beads immunopräzipitiert, wie in vorhergehenden Untersuchungen. Wildtyp Hexim1 und die Mutante Hexim1 (G257C, C297S) binden beide CycT1 und inhibieren in gleicher Weise die Transaktivierungsfunktion der Gal4.CycT1 aktivierten Transkription (Abb. 15C). Die Mutationen, die zur Etablierung der Fluoreszenzexperimente eingefügt wurden, verändern also nicht die zelluläre Aktivität des Hexim1 Proteins.

Zur weiteren Analyse der Bindungsdynamik zwischen Hexim1-TBD und CycT1 wurden „Stopped Flow“-Experimente durchgeführt. Dabei wurden jeweils gleiche Volumina einer 1.5 μM TBD-EDANS Lösung mit unterschiedlich konzentrierten GST-CycT1 (1-292) Lösungen (3-15 μM) sehr schnell in einer Messzelle vermischt und der Verlauf der Fluoreszenzemission über die ersten 2 Sekunden der Bindungsreaktion aufgenommen (Abb. 15D). Die Änderung der Intensität wurde dabei in einem Wellenlängenbereich von 420-600 nm aufgenommen. Die experimentellen Assoziationsverläufe entsprachen einer einfachen Exponentialkurve, was einer direkten Bindung entspricht. Aus diesen Messdaten konnte die Assoziationskinetik von CycT1 und Hexim1-TBD unter der Annahme von pseudo first order Bedingungen erhalten werden (Abb. 15F). Die gemessenen scheinbaren Raten k_{obs} wurden aus den jeweiligen Anpassungen der Spektren in A für die entsprechenden CycT1 Konzentrationen erhalten. Sie umspannen einen Bereich von 3.2 bis 40 s^{-1} . Bei Auftragung der scheinbaren Raten gegen die Endkonzentrationen von CycT1 wurden mit einer linearen Anpassung die Assoziationsrate $k_{\text{on}} = 2.59 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Steigung) und die Dissoziationsrate $k_{\text{off}} = 1.47 \text{ s}^{-1}$ (y-Achsenabschnitt) erhalten. Zur genaueren Bestimmung der Dissoziationsrate k_{off} des TBD/CycT1 Komplexes wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Ein vorgeformter Komplex aus 1.5 μM TBD-EDANS und 1.5 μM GST-CycT1 (1-292) wurde mit einem Überschuss an nicht markierter TBD (45 μM) in der Zelle gemischt. Aus der Anpassung des gemessenen Spektrums mit einer einfachen Exponentialkurve resultiert eine Dissoziationsrate k_{off} von 1.42 s^{-1} (Abb. 15E). Dieser Wert stimmt mit der in den Assoziationsexperimenten erhaltenen Dissoziationsrate sehr gut überein. Die molekulare Affinität, die aus den Stopped Flow Experimenten berechnet wurde, weist eine Dissoziationskonstante $K_d = 0.56 \mu\text{M}$ für CycT1 und Hexim1-TBD Interaktion auf.

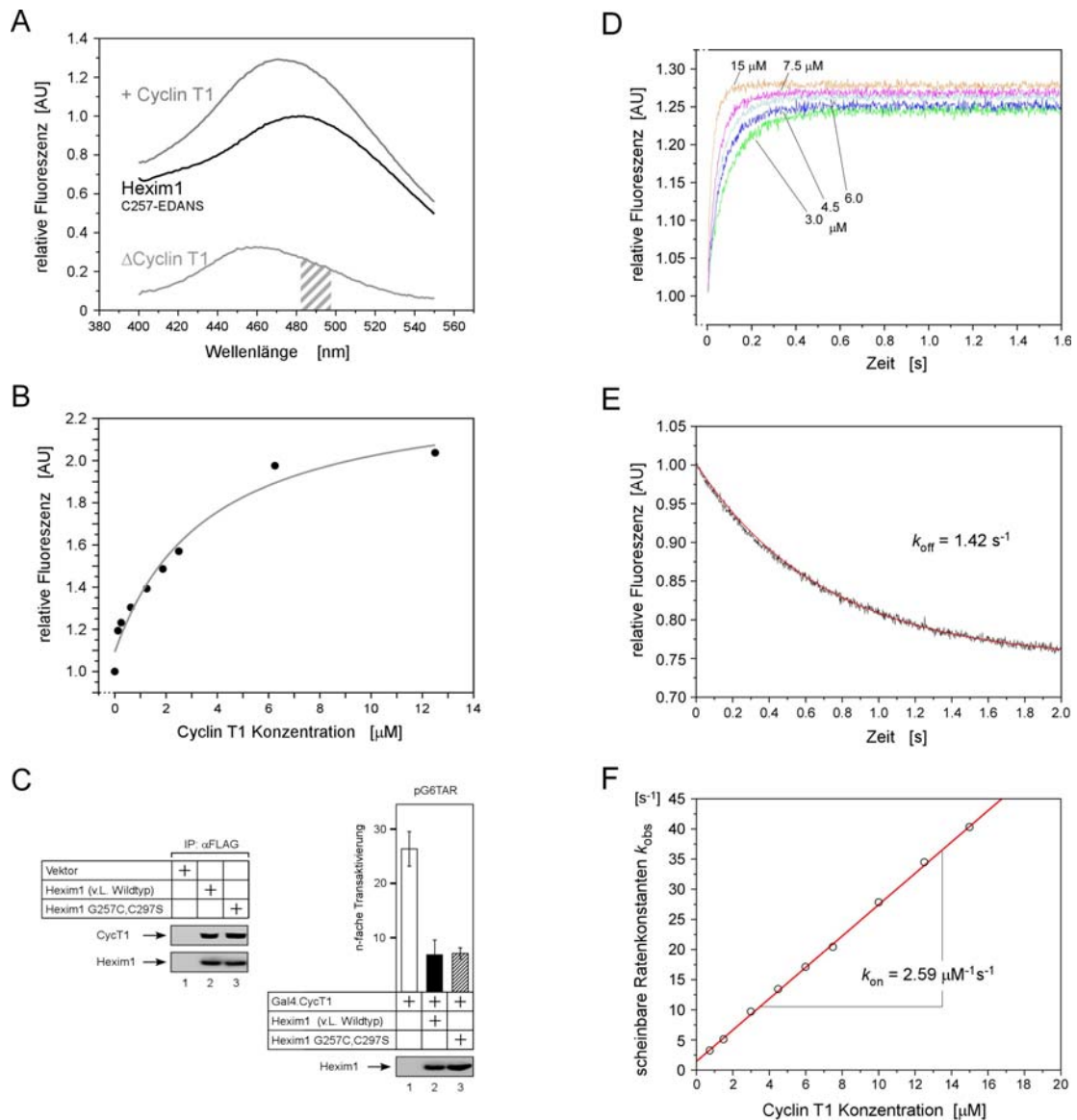


Abbildung 15: Bindungskinetik der Interaktion von Cyclin T1 und Hexim1. (A) Das Spektrum von 0.5 μ M Hexim1-TBD-EDANS (schwarz), nach Zugabe von 10 μ M CytT1 (1-292) (blau) und das Differenzspektrum (rot) ist gezeigt. (B) Gleichgewichtstitration von 1.5 μ M Hexim1-TBD-EDANS mit ansteigenden Konzentrationen von CytT1 (0.375 - 12.5 μ M) identifiziert eine Dissoziationskonstante $K_d = 2.6 \mu\text{M}$. Die relative Fluoreszenzintensität wurde gegen die Verdünnung korrigiert. (C) Die für Fluoreszenz Markierung eingesetzte Mutante Hexim1 (G257C/ C297S) verhält sich in Zellen genauso wie wildtyp Hexim1. Dazu wurde Hexim1 in HeLa Zellen exprimiert und immunopräzipitiert mit anti-FLAG beads (linke Seite). Wildtyp und Mutante haben ähnliche Inhibierungseigenschaften für die Transaktivierungsfunktion der Gal4.CycT1 aktivierten Transkription (rechte Seite). (D) stopped flow Messungen zur Bestimmung der scheinbaren Assoziationsraten. Die finale Proteinkonzentration der Hexim1-TBD-EDANS war in allen Ansätzen 1.5 μ M. Die Konzentration des Liganden GST-CycT1 (1-292) variierte zwischen 3 und 15 μ M. Jedes Fluoreszenzspektrum ist aus acht einzelnen Messungen gemittelt und die Messwerte auf das initiale Fluoreszenzsignal bei $t=0$ normalisiert. (E) Dissoziation des Hexim1-TBD-EDANS/CycT1 Komplexes durch Zugabe nicht markierter Hexim1-TBD im Überschuss. 1.5 μ M Komplex wurden im Verhältnis 1:1 (v/v) mit 30fachem Überschuss an TBD in der Zelle gemischt. Die Dissoziationsrate $k_{off} = 1.42 \text{ s}^{-1}$ wurde durch Anpassung der Messwerte an eine einfache Exponentialkurve erhalten. (F) Assoziation von CytT1 und Hexim1-TBD. Die Messdaten aus (A) wurden unter der Annahme von pseudo first order Bedingungen ausgewertet. Die apparenten Assoziationsraten k_{obs} wurden durch Anpassung der Spektren in (A) an eine einfache Exponentialkurve erhalten. Durch Auftragung der apparenten Assoziationsraten gegen die entsprechenden finalen CytT1 Konzentrationen und eine lineare Anpassung dieser Kurve wurden die Raten $k_{on} = 2.59 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aus der Steigung und $k_{off} = 1.47 \text{ s}^{-1}$ aus dem Y-Achsenabschnitt erhalten.

4.5 Konkurrenz der Bindung von Hexim1 und HIV-1 Tat an CycT1

Das HIV-1 Tat Protein stimuliert die Transkription viraler mRNA über die Interaktion zu CycT1 (Wei et al., 1998). Es ist bekannt, dass diese Interaktion über die N-terminalen Cyclin-Boxen von CycT1 stattfindet (Fujinaga et al., 1998; Garber et al., 1998), welche ebenso die Bindungsfläche zu der Hexim1-TBD darstellen. Somit ist von Interesse, ob die Fähigkeit der beiden Proteine, CycT1 zu binden, sich gegenseitig beeinflusst. Michels et al. (2003) konnten zeigen, dass CycT1, welches mit 7SK RNA, Hexim1 und Cdk9 im inhibierten Komplex vorliegt, nicht für Tat Bindung zugänglich ist. Zur weiteren Aufklärung dieser Fragestellung sollten die Effekte des HIV-1 Tat Proteins auf die Interaktion zwischen CycT1 und Hexim1-TBD *in vitro* untersucht werden.

In GST pulldown Versuchen mit an GSH immobilisiertem GST-CycT1 (1-292) wurde zunächst die Bindung von Hexim1-TBD und Tat an die Cyclin-Boxen von CycT1 bestätigt (Abb. 16A). Dabei wurde das Hexim1-TBD Fragment (255-359) und eine C-terminal verkürzte HIV-1 Tat (1-86) Variante eingesetzt. Die Klonierung, Expression und Reinigung des Tat Proteins ist im Methodenteil aufgeführt. In Bindungsexperimenten zeigten sowohl Hexim1-TBD als auch HIV-1 Tat CycT1 Bindung (Abb. 16A, Spuren 2, 4, 5). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Proteine allein oder gemeinsam in einem Versuchsansatz vorlagen. Bei gleicher Konzentration von Tat und Hexim1-TBD ist eine leichte Präferenz für Tat Bindung an CycT1 erkennbar. Jedoch ist eine transkriptional aktive Fusions-Chimäre aus CycT1 und Tat (Fujinaga et al., 2002) nicht in der Lage Hexim1-TBD zu binden (Abb. 16A, Spur 3). In einer weiteren Serie von pulldown Versuchen mit an GSH immobilisiertem Tat Protein konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass CycT1 kopräzipitiert (Abb. 16A, Spur 9). Zur Überprüfung der möglichen Bildung eines ternären Komplexes, wurde ein Komplex aus CycT1 und Hexim1-TBD in GST-Pulldown Experimenten mit GST-Tat eingesetzt (Abb. 16A, Spur 10). Hierbei zeigte sich, dass mit GST-Tat nur CycT1 kopräzipitiert, so dass eine wechselseitig exklusive Bindung vermutet werden kann. Eine gleichzeitige Interaktion der drei Proteine konnte hier nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise kompetieren Tat und Hexim1-TBD um die gleiche Bindungsstelle auf CycT1 oder Bindung von Tat an CycT1 könnte gleichzeitige Interaktion mit der TBD durch sterische Hinderung oder induzierte strukturelle Änderungen in CycT1 unterbinden.

Zur weiteren Untersuchung dieses Modells wurden Methoden der Größenausschlusschromatographie eingesetzt (Abb. 16B). Die Elutionsprofile der Proteine CycT1, Hexim1-TBD und des Komplexes CycT1/TBD entsprachen den Profilen der vorangegangenen Chromatographie-Experimente (siehe Abb. 13). Komplexbildung zwischen Tat und CycT1 war durch eine Änderung zu einer früheren Elutionszeit von 19.3 min im Vergleich zu 21 min für CycT1 allein nachzuweisen. Auffallend ist, dass trotz fast identischer Molekulargewichte von Tat (11.8 kDa) und TBD (12.5 kDa) die individuellen Komplexe mit CycT1 eine unterschiedliche Größe aufweisen, was durch stark unterschiedliche Retentionszeiten widerspiegelt wird. Zur Überprüfung eines ternären Komplexes wurden die drei Proteine CycT1, Tat und TBD in gleichen Konzentrationen vor der Chromatographieanalyse für 30 min inkubiert. Das Elutionsprofil zeigt kein Indiz für die Bildung des ternären Komplexes. Dieser sollte eine kürzere Retentionszeit als die des CycT1/TBD Komplexes (17.6 min) aufweisen. Der CycT1/Tat Komplex dominiert stattdessen und nur ein geringer Teil von CycT1 assoziiert mit Hexim1-TBD. Auch hier scheint die stärkere Bindung an Tat über die

CycT1/Hexim1-TBD Interaktion zu dominieren und eine Komplexbildung aus allen drei Proteinen durch ähnliche Bindungsstellen unterbunden zu sein. Damit kann HIV-1 Tat möglicherweise den inhibitorischen Effekt von Hexim1 aufheben, indem es die Interaktion zwischen CycT1 und Hexim1 aufhebt und so P-TEFb freisetzt zur Aktivierung der Transkription.

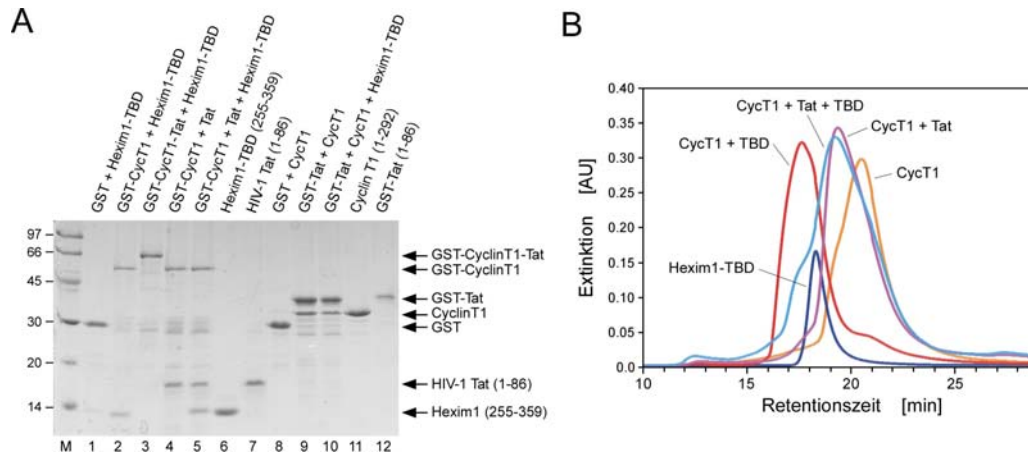


Abbildung 16: Bindungskompetition zwischen HIV-1 Tat und Hexim1 an Cyclin T1. (A) GST pull-down Experimente deuten auf eine wechselseitig exklusive Bindung von Hexim1 und Tat zu CycT1 hin. Bindung von Hexim1-TBD und/oder Tat (1-86) an jeweils GST-CycT1 (1-292) oder an ein GST-CycT1-Tat Fusionsprotein und Bindung von CycT1 an GST-Tat (1-86) ohne und in Gegenwart von Hexim1-TBD wurden getestet. Kontrollen mit GST wurden durchgeführt. Die GST Fusionsproteine waren an GSH-beads gekoppelt und die Präzipitation der potentiellen Bindungspartner wurde getestet. Gebundene Proteine wurden wie in Abb. 12 durch Coomassie Färbung im SDS Gel detektiert. Die Proteinfragmente allein sind mit 40% der im Assay eingesetzten Menge dargestellt. Auf eine detaillierte Analyse der Ergebnisse wird im Text eingegangen. **(B)** Größenausschlusschromatographie von CycT1, Tat und Hexim1-TBD zeigt eine Präferenz zur Bildung des CycT1/Tat Komplexes gegenüber dem CycT1/TBD Komplex. Ein ternärer Komplex aus Tat, TBD und CycT1 kann nicht identifiziert werden. Die Zugabe von Tat (1-86) zu CycT1 führt ebenfalls zur Komplexbildung (magenta). Trotz vorheriger Inkubation der drei Proteine in gleichen Mengen kann keine ternäre Komplexbildung in der Gelfiltration nachgewiesen werden (hellblau).

4.6 Mutationsstudien zu Untersuchungen der Interaktionsfläche in Hexim1 und Cyclin T1

Parallel zu Kristallisationsversuchen des gereinigten Komplexes aus CycT1 (1-292) und Hexim1-TBD (255-359) wurden Mutationsstudien durchgeführt, um die an der Bindung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren und deren individuellen Beitrag zur Komplexbildung aufzuklären.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Dames und Prof. Dr. Stephan Grzesiek am Biozentrum der Universität Basel, sowie André Schönichen, MPI Dortmund, die Struktur des Hexim1-TBD (255-359) Fragments mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Die Hexim1-TBD bildet ein paralleles, zweigeteiltes, homodimeres coiled coil mit einer kurzen vorhergehenden α -Helix (Abb. 17B). In Abb. 17A ist ein TBD Monomer schematisch dargestellt. Das erste coiled coil Segment erstreckt sich von Aminosäure 284-313 und das C-terminale Segment beinhaltet die Aminosäuren 319-348. Linksdrehende coiled coil Strukturen enthalten charakteristische Wiederholungen von sieben Aminosäuren, die sogenannten Heptad repeats, die mit $(abcdefg)_n$ bezeichnet werden. Die Aminosäurenabfolge kann in einem helikalen Rad dargestellt werden (Abb. 17C). In dieser Darstellung ist erkennbar, dass die Interaktionsfläche der beiden parallelen Helices im coiled coil durch Reste an Positionen a, d und a', d' gebildet wird. Sind an Positionen g und e' entgegengesetzt geladene Aminosäuren zu finden, können diese Paare die Interaktion des Homodimers durch elektrostatische Wechselwirkungen stärken. Dementsprechend können gleiche Ladungen die Interaktion schwächen. Das flexible N-terminale coiled coil Segment ist überwiegend negativ geladen und weist durch mehrere Abweichungen von der Konsensussequenz eine weniger feste Packung auf als das C-terminale Segment. In NMR Titrationsstudien konnte diese Annahme untermauert werden. Die zwölf am meisten betroffenen Signale nach Titration von CycT1 zu ^{15}N -markierter Hexim1-TBD gehörten ausnahmslos zu Aminosäuren des N-terminalen Segments.

Basierend auf diesen NMR Kartierungsstudien und den zuvor genannten Strukturmerkmalen in der coiled coil Hexim1-TBD Kristallstruktur (Dames et al., 2006) wurden 16 unterschiedliche Punktmutanten der TBD generiert, die Mutationen zwischen den Resten E277 und N311 aufwiesen. Die Positionen der Mutationen sind zur Übersichtlichkeit in Abb. 18C dargestellt. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen und den Einfluss der Mutanten auf die Integrität der TBD Struktur zu minimieren, wurden Alanin Mutationen generiert. Reste an Position d der Heptad repeats würden ebenfalls die intermolekulare coiled coil Interaktionsfläche destabilisieren und wurden deshalb nicht mutiert. Die Ladungsverteilung auf der Oberfläche des N-terminalen Segments der TBD deutet auf elektrostatische Interaktion bei der Erkennung von Bindungspartnern hin. Um den Einfluss dieser geladenen Reste zu analysieren, wurde die Dreiermutante (E286A/E290A/E293A) kreiert, die im Folgenden 3E-A genannt wird. Diese Mutante hebt den negativ geladenen Bereich am N-Terminus des ersten coiled coil Segments weitgehend auf.

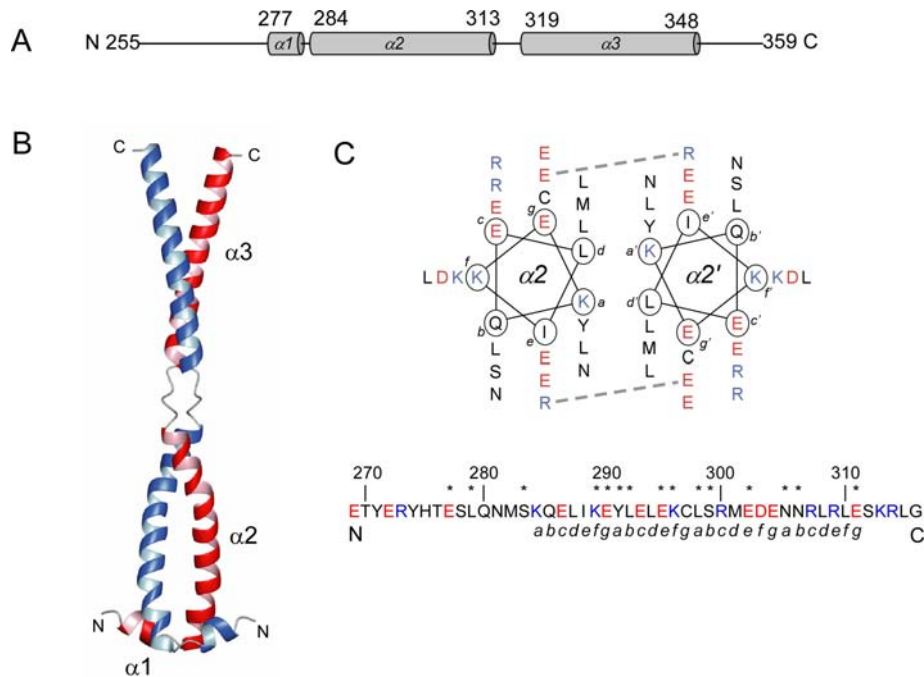
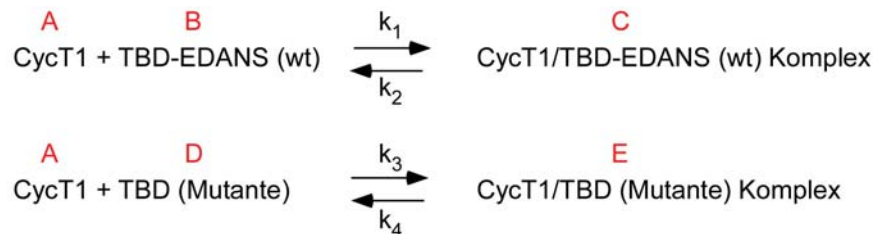


Abbildung 17: Die Cyclin T1-bindende Domäne von Hexim1 besitzt eine parallele coiled coil Struktur. (A) Darstellung des schematischen Aufbaus der TBD. Eine kurze α -Helix $\alpha 1$ ist den coiled coil Segmenten ($\alpha 2$ und $\alpha 3$) vorgelagert. (B) Bänderdarstellung der dimeren TBD (Dames et al., 2006). Die unterschiedlichen Ketten sind jeweils rot und blau gefärbt. (C) Darstellung des helikalen Rads des N-terminalen coiled coil Segments ($\alpha 2/\alpha 2'$). Die Heptadpositionen a-g der coiled coil Segmente sind dargestellt. Wechselwirkungen zwischen den g- und e'-Positionen der beiden Ketten sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Positive Reste sind hier blau, negative rot gefärbt. Mutationen in $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sind in der TBD Sequenz durch einen Stern gekennzeichnet.

Zuerst wurden pulldown Experimente mit an GSH-Sepharose-beads gekoppeltem GST-CycT1 Protein und jeweils einer TBD Mutante durchgeführt. In Abbildung 18A ist dargestellt, dass erwartungsgemäß wildtyp TBD effizient mit GST-CycT1 koprizipitierte, aber nicht mit GST. Die einzelnen Punktmutanten zeigten keinen Verlust der Bindung und eine signifikante Abnahme der Bindungsstärke war nicht festzustellen. Stattdessen koprizipitierten alle Mutanten mit CycT1 aus der Lösung und eine zwei- bis vierfache Abnahme der Bindungsaffinität konnte nur bei den Mutationen K289A, L292A, E302A und 3E-A detektiert werden, was an einer Verringerung der Bandenstärke im SDS Gel erkennbar war. Keine der generierten Punktmutanten war ausreichend, um die Bindung an CycT1 drastisch zu reduzieren oder gar vollständig zu inhibieren. Der Beitrag einzelner Aminosäuren zur Interaktion ist somit vermutlich eher gering, so dass stattdessen eher vermutet werden kann, dass eine relativ große Oberfläche die Bindung generieren könnte.

Zur qualitativen Analyse der Bindungsaffinität der Mutanten wurde ein Fluoreszenz-Kompetitions-Assay entwickelt, wie er in (Goody, 2003) beschrieben wurde. Der Assay basiert auf der Verdrängung der fluoreszenzmarkierten, wildtyp TBD aus dem vorgeformten 1:2 Komplex CycT1/TBD-EDANS durch Zugabe eines Überschuss der jeweiligen, nicht markierten Hexim1-TBD Mutante. Für die Einstellung eines äquimolaren Komplexes ist das Verhältnis 1:2 für CycT1/TBD notwendig, da parallel zur Strukturlösung der TBD in ITC Experimenten gezeigt wurde, dass ein

stabiles TBD coiled coil Dimer ein CycT1 Molekül bindet. Die Auswertung der Messergebnisse wurde mit dem Programm Scientist mit den bekannten Raten der Bindung für das wildtyp Protein ($k_1 = 3.5 \text{ s}^{-1}\mu\text{m}^{-1}$ und $k_2 = 12 \text{ s}^{-1}$) durchgeführt. Das Schema dieser Verdrängungsreaktion ist hier dargestellt und das zugehörige Gleichungssystem im Anhang aufgeführt.



Schema 1: Schematische Darstellung der Verdrängungsreaktion durch die verschiedenen TBD Mutanten. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Scientist mit den bekannten Raten für die wildtyp Hexim1/CycT1 Interaktion ($k_1 = 3.5 \text{ s}^{-1}\mu\text{m}^{-1}$ und $k_2 = 12 \text{ s}^{-1}$).

Ein äquimolarer Komplex aus $5 \mu\text{M}$ CycT1 und $5 \mu\text{M}$ fluoreszenz-markiertem TBD-EDANS Dimer wurde in der Stopped Flow Messzelle mit einem 20-fachen Überschuss an nicht markierter TBD Dimer Mutante ($100 \mu\text{M}$) gemischt. Der Verlauf der Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 0.5 s detektiert. Die Dissoziation mit wildtyp TBD führte zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität um 23% in relativen Fluoreszenzeinheiten und die Zugabe von Puffer zu 4% Fluoreszenzabfall. Der Verlauf der Fluoreszenzabnahme für die jeweiligen Hexim1-TBD Fragmente ist in Abb. 18B dargestellt. Einige Mutanten zeigten eine signifikant verminderte Fähigkeit, TBD-EDANS aus dem Komplex zu verdrängen. Für acht Mutanten wurde ein mehr als vierfach größerer Wert der Dissoziationskonstanten bestimmt, was einer mindestens vierfach schwächeren Assoziation entspricht: E311A ($K_d = 11 \mu\text{M}$), E302A ($12.5 \mu\text{M}$), L292A ($14 \mu\text{M}$), L298A ($19 \mu\text{M}$), S299A ($20 \mu\text{M}$), K296A ($22 \mu\text{M}$), L279A ($24 \mu\text{M}$) und K289A ($32 \mu\text{M}$), sowie die Dreiermutante 3E-A ($33 \mu\text{M}$). Die Assoziations- und Dissoziationsraten der wildtyp TBD Bindung an CycT1 wurden schon im Verlauf dieser Arbeit bestimmt (Schulte et al., 2005; Abb. 15). Mit Hilfe dieser Daten ($k_{\text{on}} = 2.59 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 1.47 \text{ s}^{-1}$) konnten für einige Mutanten, deren Kurvenverlauf deutlich von der Dissoziation des wildtyp Proteins abwich, die kinetischen Parameter bestimmt werden, die in Tabelle 2 aufgeführt sind. Auf einige Mutanten soll hier genauer eingegangen werden. Die Mutante L292A wies eine vierfach höhere k_{off} Rate auf als die wildtyp TBD, hatte aber eine ähnliche k_{on} Rate. Die Zunahme der k_{off} Rate wird typischerweise bei Verlust einer hydrophoben Interaktion detektiert. Auffallend ist, dass K289A, K296A und 3E-A im Gegensatz dazu verminderte k_{on} Raten zeigen, was für die elektrostatisch getriebene Interaktion zweier Moleküle spricht. Basierend auf diesen Mutationsstudien lässt sich eine molekulare Interaktion vermuten, die eine große Oberfläche umspannt und durch ionische Wechselwirkungen getrieben ist.

Der Verlust der elektrostatischen Assoziation nach der Mutation eines polaren Clusters auf der Bindungsoberfläche der TBD lässt auf der CycT1 Oberfläche ebenso polare Reste vermuten, die zur Bindung beitragen. Eine positiv geladene Region (TRM) in den Cyclin-Boxen, für die gezeigt wurde, dass sie in die HIV-1 Tat/TAR Interaktion involviert ist (Garber et al., 1998), wurde daraufhin

für Bindungsstudien mutiert. Es entstand eine Alanin-Mutante KR4A, in der die folgenden vier Reste im CycT1 Konstrukt (1-281) mutiert wurden: K247, R251, K253 und R254. Mit stopped flow Messungen wurde wiederholt für wildtyp CycT1 und zusätzlich für die Mutante KR4A die Bindungskinetik analysiert (Abb. 18C). Die Bindungsdaten für den Wildtyp stimmten mit den zuvor bestimmten Daten überein (Abb. 15). Es konnte eine mehr als sechsfach schwächere Assoziationsrate k_{on} und eine dreifach höhere Dissoziationsrate k_{off} für die CycT1 Mutante KR4A gemessen werden, was in einer Dissoziationskonstante von $K_d = 68 \mu\text{M}$ für die CycT1(KR4A)/TBD Affinität resultierte. Die Ergebnisse der Mutationsstudien sind mit der Struktur der TBD zur Veröffentlichung eingereicht (Dames et al., 2006). Auch diese Ergebnisse unterstützen das Model einer elektrostatischen Wechselwirkung der CycT1/TBD Assoziation.

Tabelle 2: Bindungskonstanten für verschiedene Hexim1-TBD Mutanten. Die Dissoziationskonstanten K_d sind durch Fluoreszenz-Kompetitionsexperimente ermittelt worden (siehe Abb. 18). Assoziations- und Dissoziationsraten, k_{on} und k_{off} , konnten bei signifikanter Abweichung des Verlaufs der Verdrängungskurve der Mutante vom Verlauf der Dissoziation durch wildtyp TBD ebenfalls über dieses Experiment bestimmt werden. Die Berechnung wurde mit dem Programm Scientist mit den bekannten Raten der Bindung für das wildtyp Protein durchgeführt. Die Buchstaben hinter den Mutanten geben die Position der mutierten Aminosäure im coiled coil Heptad an.

TBD (255-359)	K_d (μM)	k_{on} ($\text{s}^{-1}\mu\text{m}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	rel. Fluoreszenz
WT	3.4	3.5	12	0.770
E277A	5	n.d.	n.d.	0.782
L279A	24			0.842
S283A	6.5	n.d.	n.d.	0.782
K289A f	32	1.3	41	0.854
E290A g	3	n.d.	n.d.	0.771
Y291A a	6	n.d.	n.d.	0.788
L292A b	14	3.5	50	0.815
E295A e	2.8	n.d.	n.d.	0.765
K296A f	22	1.2	26	0.837
L298A a	19	n.d.	n.d.	0.831
S299A b	20	1.3	26	0.845
E302A e	12.5	n.d.	n.d.	0.813
N305A a	7.6	n.d.	n.d.	0.800
N306A b	8.5	n.d.	n.d.	0.796
E311A g	11.5	n.d.	n.d.	0.803
E286A/E290A/ E293A c,g,c	33	1.0	33	0.868

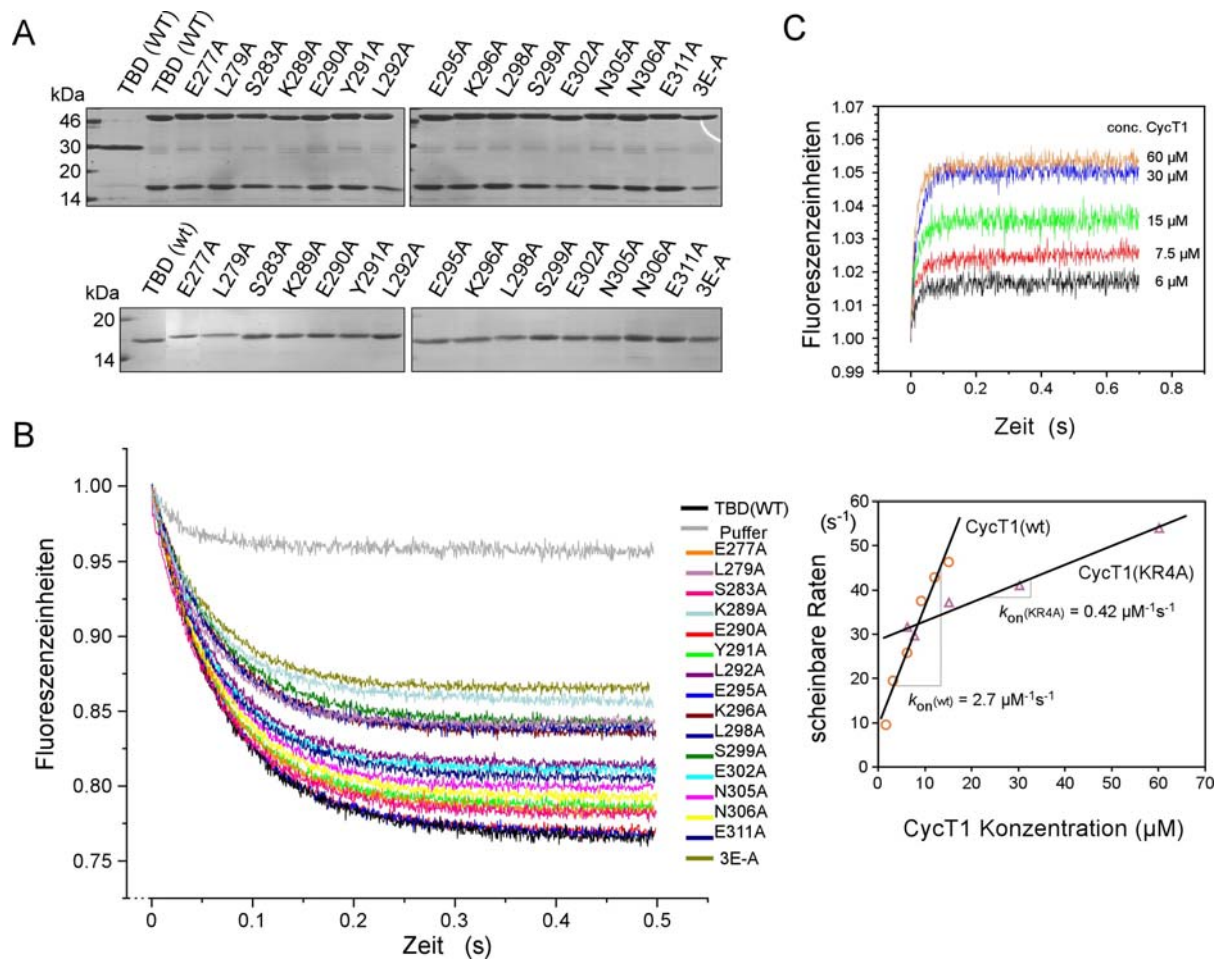


Abbildung 18: Mutationsstudien zur Hexim1-TBD/Cyclin T1 Interaktion. (A) *In vitro* GST pull-down Experimente. Die Bindung gleicher Mengen wildtyp TBD oder verschiedener TBD Mutanten an GST-CycT1 (1-292), das an GSH-beads gekoppelt war, wurde analysiert. Gebundene Proteine wurden wie in Abb. 12 durch Coomassie Färbung im SDS Gel detektiert, wobei die Bandenstärken proportional zur Bindungsstärke sind. **(B)** stopped flow Dissoziations-Kompetitionsexperimente zwischen CycT1, fluoreszenzmarkierter TBD-EDANS und einem Überschuss der jeweiligen unmarkierten TBD Mutante. Ein equimolarer Komplex CycT1/TBD-EDANS (5 μM) und ein 20-facher Überschuss einer nicht fluoreszenzmarkierten TBD Dimer Mutante (100 μM) oder einmalig Pufferlösung wurden in der Messzelle vermischt. Kompetitive Dissoziation des CycT1/TBD-EDANS Komplexes durch die nicht markierte TBD Mutante führte zu einem für jede Mutante charakteristischen Verlauf der Abnahme des Fluoreszenzsignals. Die daraus berechneten Bindungskonstanten und kinetischen Parameter sind in Tabelle 1 aufgeführt. **(C)** stopped flow Messungen mit einer CycT1 Mutante. Bindungsstudien zwischen wildtyp TBD und wildtyp CycT1 (1-292) wurden wie in Abb. 15 aufgenommen. Die gleichen Experimente wurden daraufhin mit der CycT1 Mutante KR4A durchgeführt (dargestellt im oberen Teil der Abbildung). Im Vergleich zum Wildtyp wurde die Bindungsaffinität durch Mutation der positiven Ladungen 20-fach reduziert. Ursache für die Abnahme ist hauptsächlich eine stark erniedrigte Assoziationsrate k_{on} (unteres Diagramm), was für die elektrostatische Interaktion zweier Moleküle spricht.

II. Strukturuntersuchungen des CyclinT1/Tat/TAR Komplexes

Parallel zu den Untersuchungen am inhibitorischen P-TEFb Komplex (Kapitel 1) wurden im Verlauf dieser Arbeit auch Studien des aktivierenden Komplexes, der speziell die HIV Transkription einleitet, durchgeführt. Analog zu dem System der Inhibierung von P-TEFb, die durch die 7SK snRNA und das Hexim1 Protein erfolgt, wird dabei die Transaktivierung der HIV-1 Genexpression über eine RNA und ein virales Protein angeschaltet. Von großem Interesse war neben der biochemischen Charakterisierung dieser beiden Prozesse die Aufklärung der möglichen gemeinsamen oder spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Mechanismen. Der Transkription stimulierende Komplex, der P-TEFb an den HIV Promotor leitet, besteht aus dem viralen Transkriptionsaktivator Tat und der TAR („transactivation response element“) RNA aus dem 5'-LTR, die den zellulären P-TEFb Komplex über die Assoziation von CycT1 mit Tat/TAR an den HIV Promotor rekrutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Expressionsstudien mit CycT1 und Tat durchgeführt und die Synthese der TAR RNA etabliert. Darauf aufbauend konnte die Komplexformierung dieses ternären Komplexes in einem elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstest (EMSA) gezeigt werden. Die Analysen sollten in der Generierung geeigneter Konstrukte für Kristallisationsstudien des ternären CycT1/Tat/TAR Komplexes, der für HIV-1 schematisch in Abb. 19C dargestellt ist, münden.

4.7 Darstellung des ternären Komplexes aus Cyclin T1, Tat und TAR RNA

Das virale Transaktivatorprotein Tat bindet die TAR RNA zur Aktivierung der HIV-1 Gene. TAR formt eine stabile Haarnadelschleife am 5'-Ende jedes viralen Transkripts im LTR. Obwohl Tat *in vitro* allein die 5'-Ausstülpung (bulge) (nt 23-25) in TAR binden kann, ist der zentrale Loop der TAR RNA (nt 31-36) für Tat Transaktivierung *in vivo* notwendig. Dieser Loop bindet an das zelluläre CycT1 Protein (Karn, 1999). Humanes CycT1 ist ein 726 Aminosäuren langes Protein, dessen Cyclin-Boxrepeat Struktur (1-250) und das „Tat-TAR recognition motif“ (TRM) von Aminosäure 251-270 für die Tat-TAR Assoziation von Bedeutung ist. In humanem CycT1 bildet das Cystein an Position 261 vermutlich einen intermolekularen Zinkfinger mit Cysteinen oder Histidinen aus Tat innerhalb der Reste (22-37) aus. Da das Cystein an der entsprechenden Stelle in murinem CycT1 zu Tyrosin ausgetauscht ist, kann mCycT1 die Tat Transaktivierung nicht beeinflussen (Garber et al., 1998). Zusätzlich zur Bildung eines intermolekularen Zinkfingers bindet Tat CycT1 über das TRM, um möglicherweise das Arginin-reiche Motiv in Tat zur RNA Bindung richtig zu positionieren. Das TRM in CycT1 enthält ebenso positiv geladene Reste, die als weiteres RNA Bindungsmotiv agieren. Die N-terminalen 272 Reste in humanem CycT1 sind ausreichend, um *in vitro* Tat und TAR zu binden und *in vivo* die Transaktivierung auszulösen. Jedoch scheint der C-Terminus von CycT1 eine inhibierende Rolle in dieser Interaktion zu spielen (Garber et al., 2000). Diese Beobachtungen deuten auf die Bildung eines dynamischen Komplexes hin und lassen erkennen, dass strukturelle Untersuchungen dieser RNA-Protein Assoziation schwierig sind. Bis heute konnte die molekulare

Interaktion zwischen CycT1, Tat und TAR noch nicht durch eine Struktur des CycT1/Tat/TAR Komplexes gezeigt werden.

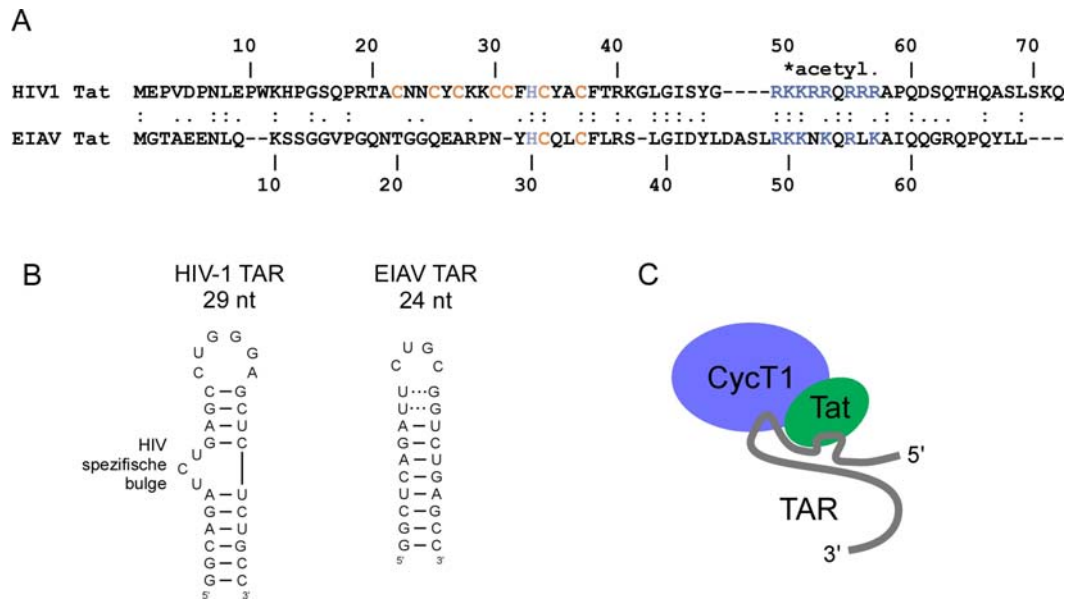


Abbildung 19: Vergleich der HIV- und EIAV-Tat und TAR Sequenzen und Schema der Komplexbildung des transaktivierenden CycT1/Tat/TAR Komplexes. (A) Vergleich der HIV-1 und EIAV Tat Aminosäuresequenzen. Im Unterschied zu HIV-1 Tat besitzt EIAV Tat zwei Cysteine und ein Histidin und bildet damit vermutlich nur einen Zinkfinger aus. **(B)** Vergleich der HIV-1 und EIAV TAR RNA. Der EIAV TAR fehlt die für HIV-1 TAR charakteristische 5'-bulge. Dafür enthält sie zwei „wobble“ U-G Basenpaarungen im Loop und hat mit 8 nt einen 2 nt größeren Loop als HIV-1 TAR. **(C)** Schematische Darstellung des ternären Komplexes in HIV-1.

4.7.1 Darstellung der Fusionskonstrukte aus Cyclin T1 und equine Tat

In dieser Arbeit sollten zuerst Proteinkomplexe aus CycT1 und Tat hergestellt werden, die in anschließenden Strukturuntersuchungen im Komplex mit der TAR RNA eingesetzt werden sollten. Es wird angenommen, dass virales Tat und humanes CycT1 zur Interaktion einen intermolekularen Zinkfinger ausbilden (Garber et al., 1998). In HIV-1 Tat existieren 7 Cysteine innerhalb von 16 Resten am N-Terminus, die potentiell an der Bildung des intermolekularen und gegebenenfalls auch eines zweiten intramolekularen Zinkfingers beteiligt sind. Das HIV-1 Tat Protein ist mit diesen sieben Cysteinen innerhalb von 16 Aminosäuren für rekombinante Expression in *E. coli* weniger gut geeignet, da die korrekte Faltung von zwei potentiellen Zinkfingern in unmittelbarer Nähe problematisch sein könnte. Im Unterschied zu HIV-1 Tat besitzt Tat aus dem equine infektiösen Anemia Virus (EIAV) nur zwei Cysteine, sowie ein Histidin (Abb. 19A). Es wird vermutet, dass das Tat Protein aus dem EIA-Virus im Gegensatz zum HIV-1 Tat Protein nur einen Zinkfinger ausbildet, der von zwei Cysteinen und einem Histidin aus der N-terminalen Cystein-reichen Region in Tat koordiniert wird (Karn, 1999). Komplementiert wird der Zinkfinger durch das Cystein an Position C261 in humanem CycT1. Dabei wurde gezeigt, dass unter allen Cysteinen und Histidinresten in humanem CycT1 nur dieses C261 für die intermolekulare Zinkfinger abhängige Interaktion notwendig ist (Fujinaga et al., 2002).

Für Expressionsstudien in *E. coli* wurden deshalb zuerst humanes CycT1 und EIAV Tat eingesetzt. Um die Ausbildung des Zinkfingers zu erleichtern, wurden Fusionskonstrukte hergestellt, in denen beide Proteine über einen Linker verbunden sind und sich so schon während der Translation in räumlicher Nähe zueinander befinden. Für den Linker wurden zusätzlich verschiedene Längen getestet, um die notwendige konformationelle Flexibilität zur Komplexbildung sicherzustellen. Die verschiedenen Fusionskonstrukte sind in Abb. 20A dargestellt. N-terminales CycT1 wird mit zwei verschiedenen Linkerlängen mit eqTat verbunden. Die Fusion der beiden Proteinen in umgekehrter Anordnung resultierte in einer Proteinchimäre, die *in vivo* keine Transkriptionsaktivität aufwies (Fujinaga et al., 2002). Die hier gezeigten Konstrukte mit zwei unterschiedlichen Linkerlängen und drei unterschiedlichen eqTat Fragmentlängen führten zu löslichem Protein, von denen das Konstrukt D69 das stabilste war (Abb. 20B), das daraufhin in Kristallisationsassays eingesetzt wurde. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass alle Konstrukte Transaktivierungsaktivität *in vivo* besaßen (Fujinaga et al., 2002).

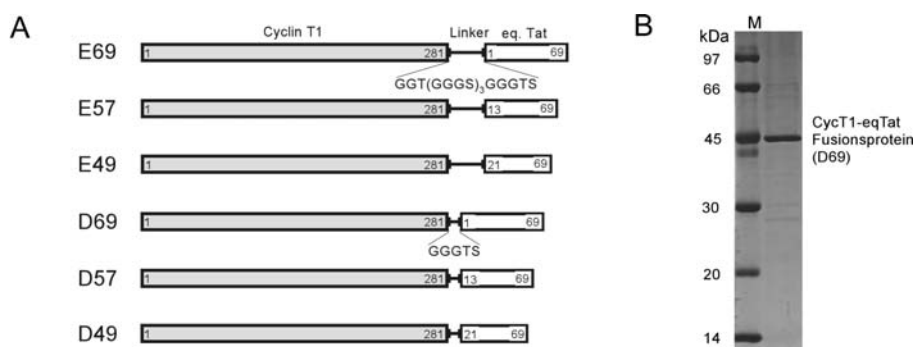


Abbildung 20: Darstellung der Fusionskonstrukte. (A) Schema der für diese Studie hergestellten Fusionskonstrukte aus humanem Cyclin T1 und equine Tat. Alle Konstrukte enthalten N-terminal CycT1 (1-281) und drei unterschiedliche Längen des equine Tat Proteins, welches über einen Linker mit CycT1 kovalent gebunden ist. (B) Darstellung der Reinheit des Fusionsproteins CycT1-eqTat (D69) aus *E. coli*.

4.7.2 Synthese der EIAV TAR RNA und Kristallisation des CycT1/Tat/TAR Komplexes

Zur Generierung des ternären RNA Protein Komplexes wurde analog zum eqTat Protein die EIAV TAR RNA synthetisiert. Im Vergleich fehlt dieser RNA die für HIV-1 TAR charakteristische 5'-Ausstülpung (bulge). Dafür enthält EIAV TAR zwei U-G „wobble“ Basenpaarungen in der Stammschleife (loop) und hat dadurch einen 8 nt großen, zentralen Loop (Abb. 19B).

Eine 24 nt lange EIAV TAR RNA wurde *in vitro* mittels eines T7-Promotors unter Verwendung des T7 RNA Polymerase Systems transkribiert. Die Methode der RNA Synthese wird im Methodenteil genauer erläutert. Die RNA sollte im Komplex mit dem zuvor hergestellten Fusionsprotein D69 kristallographisch untersucht werden. Zuvor sollte in Funktionalitätsassays die korrekte Faltung des ternären Komplexes untersucht und die für die Ausbildung eines 1:1 Komplexes notwendigen Mengen an Protein und RNA bestimmt werden. Dies wurde in einem elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstest (EMSA) durchgeführt, in dem die Bindung der RNA an das Fusionsprotein visualisiert werden konnte. In Abb. 23 ist die Bindung der RNA an das

Fusionsprotein in einem nichtdenaturierenden Acrylamidgel über UV Visualisierung dargestellt, wobei das Laufverhalten der RNA nach Ethidiumbromidfärbung sichtbar wird. Die spezifische Komplexbildung wird in einem unterschiedlichen Migrationsverhalten der freien RNA verglichen mit komplexierter RNA erkennbar. Durch ansteigende Konzentrationen des Fusionsproteins kann eine vollständige Komplexbildung der eingesetzten RNA erreicht werden, was an der kontinuierlichen Abnahme der freien RNA Menge erkennbar wird. Vollständige Komplexbildung wird für das Konstrukt D69 erst bei einem geringen molaren Überschuss an Fusionsprotein erreicht (Abb. 23). Möglicherweise ist die heterolog exprimierte Chimäre D69 in geringem Maße denaturiert. Zur Kristallisation sollte ein vollständig mit RNA gesättigter Proteinkomplex eingesetzt werden, so dass nach jeder neuen Proteinreinigung oder RNA Synthese über die EMSA Experimente das notwendige Protein/RNA Verhältnis neu bestimmt wurde.

In ersten Kristallisationsversuchen wurde die RNA mit dem Fusionsprotein für einige Minuten vor den Kristallisationsscreenings inkubiert. Eine erste Kristallisationsbedingung ergab hexagonal geformte Kristalle (Abb. 21) mit einem Durchmesser von bis zu 200 μM und einer Höhe von bis zu 50 μM . Diese Kristalle zeigten allerdings weder in der hauseigenen Diffraktionsanlage noch am SLS Synchrotron ausreichende Diffraktion. Parallel zu Versuchen, das Diffraktionsverhalten dieser Kristalle durch verschiedene Additive und Cryolösungen zu verbessern, sollten neue Protein- und RNA-Konstrukte generiert werden, die möglicherweise unter anderen Bedingungen kristallisierten, um so durch andere Symmetrien der Kristalle eine bessere Auflösung zu erhalten.

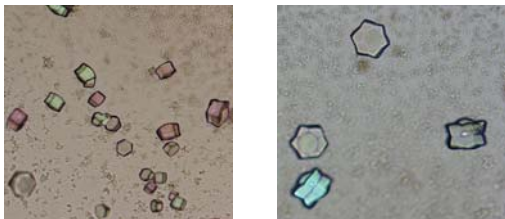


Abbildung 21: Kristalle des CycT1/Tat/TAR Komplexes. Die Kristalle wuchsen initial bei einer PEG-Bedingung und bei Raumtemperatur. Bei 4°C besaßen die Kristalle schärfere Kanten, was zu verbesserten Diffraktionseigenschaften führte.

4.7.3 Synthese und Charakterisierung verschiedener TAR RNA Konstrukte zur Veränderung der Kristallisationseigenschaften

Ein naheliegender Ansatzpunkt zur Veränderung der Kristallisationseigenschaften des ternären CycT1/Tat/TAR Komplexes bestand in der Veränderung der Fusionskonstrukte aus CycT1 und Tat. Eine N-terminale CycT1 Verkürzung (29-281) ergab allerdings ein unlösliches Protein. Verkürzungen am N-Terminus von eqTat führten zu einem Protein mit erheblich schlechteren Lösungseigenschaften. Eine andere Möglichkeit liegt in der Modifizierung des TAR RNA Konstruktes. Zur Analyse bestimmter Strukturelemente der RNA wurden distinkte Bereiche der EIAV TAR RNA modifiziert und diese Konstrukte jeweils *in vitro* synthetisiert (siehe Methodenteil). Die in den ersten Kristallisationsassays eingesetzte EIAV TAR RNA bestand aus 24 Nukleotiden und besaß als Strukturmerkmal einen 8 nt langen zentralen Loop, der zwei sogenannte „wobble“ Basenpaarungen beinhaltete.

Zuerst wurden neue EIAV TAR RNA Konstrukte unterschiedlicher Längen (30 nt, 24 nt, 22 nt und 20 nt) transkribiert, die den RNA Doppelstrang durch die Einführung zusätzlicher G-C Bindungen an den 5'- und 3'-Enden stabilisieren sollten. Die Sequenzen der generierten RNA Strukturen sind in Abb. 23 oberhalb des jeweiligen Bindungsassays zu sehen. Die Reinheit und das unterschiedliche Laufverhalten der verschiedenen großen, synthetisierten EIAV-TAR RNA Konstrukte wird Abb. 22 gezeigt.

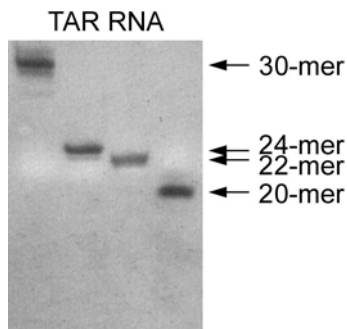


Abbildung 22: Darstellung der Reinheit und Größe der verschiedenen EIAV TAR RNA Konstrukte. Die RNA Konstrukte wurden in einem denaturierenden Acrylamidgel der Größe nach aufgetrennt. Im Gel ist erkennbar, dass die RNA einen hohen Reinheitsgrad besitzt.

In drei weiteren EIAV RNA-Konstrukten wurde der zentrale Loop variiert: es entstanden ein 6 nt langer Loop, ein 4 nt langer Loop und eine RNA mit stabilisiertem Loop. Dazu wurden sukzessive die beiden wobble Basenpaarungen U-G in stabile Paarungen C-G verändert und schließlich die 4 nt Loopsequenz anstelle von 5'GUCG3' in 5'CUUG3' umgewandelt. Diese Sequenz war aus der Literatur als eine besonders stabile Loopfaltung bekannt (Nagai and Mattaj, 1995). Schließlich wurde eine RNA als palindromische TAR Sequenz synthetisiert, so dass diese RNA keinen Loop mehr ausbildete und 2 RNA Stränge möglicherweise eine definierte dimere Struktur bilden konnten.

Zur Überprüfung der Affinität der unterschiedlichen RNA Konstrukte für CycT1-eqTat wurde die Bindung für alle RNA Fragmente wieder in einem elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstest untersucht. Weiterhin sollte das molare Verhältnis des Fusionskonstrukts zur EIAV-TAR RNA für nachfolgende Kristallisationsversuche zur Bildung eines mit RNA gesättigten Komplexes bestimmt werden. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der Transaktivierungsfähigkeit der verschiedenen RNA Konstrukte im Komplex mit CycT1-Tat (D69) in Abb. 23 dargestellt. Die erste Spur zeigt jeweils das Laufverhalten der isolierten RNA, die drei darauf folgenden Spuren zeigen die mögliche Komplexbildung mit ansteigenden CycT1-Tat Konzentrationen. Die spezifische Bindung der RNA an CycT1-eqTat war durch Verschiebung der RNA Bande zu hohen Molekulargewichten erkennbar. Die RNA Fragmente unterschiedlicher Länge schienen alle vier eine ähnlich starke Transkriptionsaktivierung mit D69 zu zeigen. In den Ansätzen wurde die RNA bei der höchsten Proteinmenge (4 μM) vollständig gebunden. Nur die 24 nt lange RNA schien eine etwas bessere Affinität zu CycT1-Tat aufzuweisen, denn schon bei geringerer Proteinkonzentration (3 μM) wurde die gesamte RNA Menge (2 μM) von CycT1-eqTat gebunden. Die 6 nt lange Loop RNA assoziierte ebenfalls mit D69, was durch die Komplexbande nachgewiesen ist. Im Gegensatz dazu ließ sich für die RNA's mit dem 4 nt langen Loop und dem stabilisierten Loop kaum Komplexbildung nachweisen. Die palindromische RNA assoziierte mit D69, was vermutlich zu einem Komplex führte, der aus zwei RNA Molekülen und zwei Fusionsproteinen besteht. Die Änderungen in den Bindungsaffinitäten schienen so signifikant zu sein, dass Manipulationen an der Nukleotidsequenz der Stammschleife für ungeeignet eher abgesehen wird.

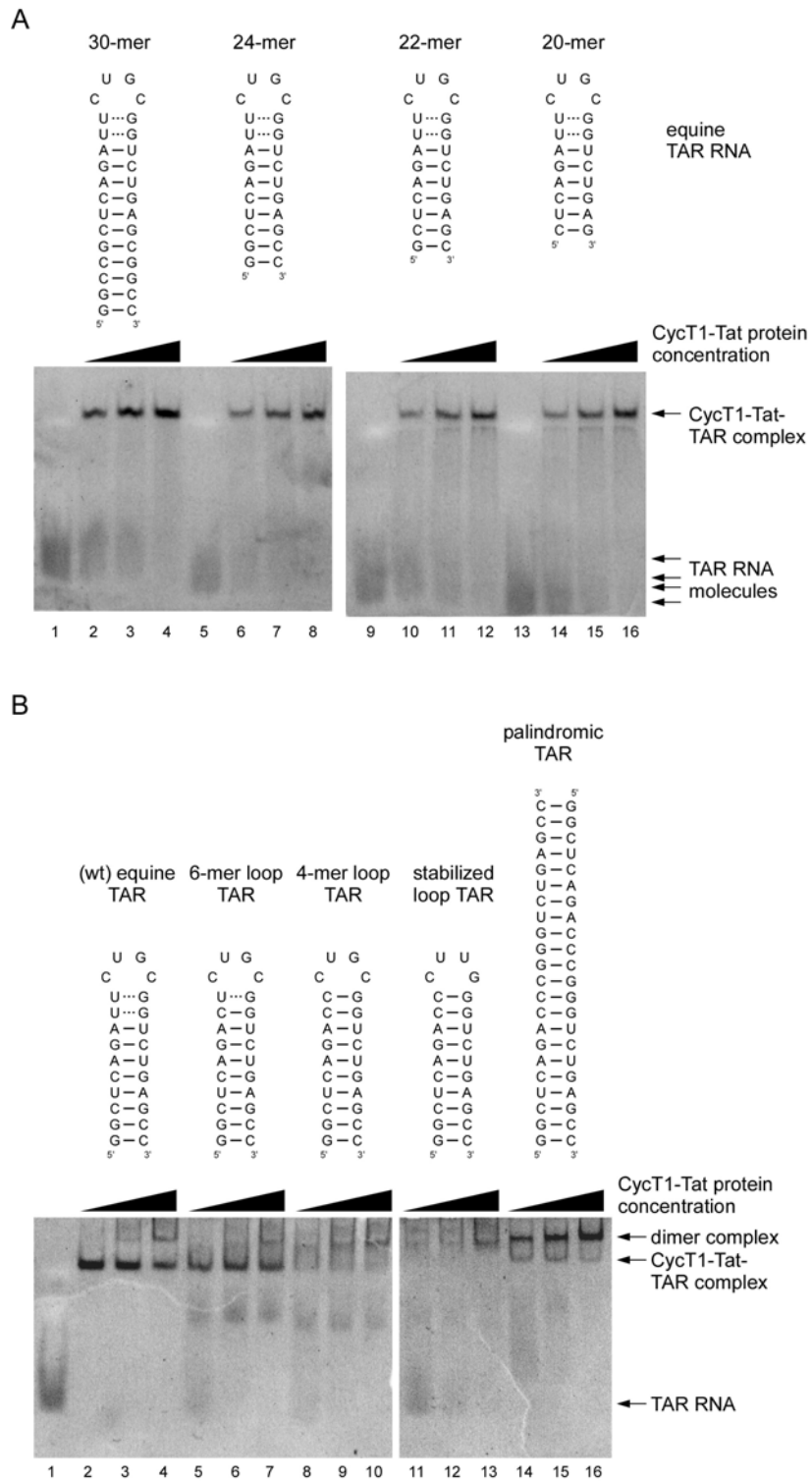


Abbildung 23: Einfluss verschiedener EIAV-TAR RNA Elemente auf die Bindung zum CycT1-eqTat Fusionsprotein. Die RNA wurde mittels Ethidiumbromid gefärbt, in UV-Licht visualisiert und ist in der Abbildung invertiert dargestellt. Über den jeweiligen Spuren ist die entsprechende RNA Struktur dargestellt. Die Konzentration der RNA wurde in jedem Ansatz mit 2 µM konstant gehalten und die Konzentration des Fusionsproteins schrittweise erhöht. Die Ansätze wurden für 30 min zur Komplexbildung bei RT inkubiert und anschließend mit 2 µl Ladepuffer gelelektrophoretisch analysiert. Die Protein-RNA Komplexbildung ist durch Abnahme der Bande der isolierten RNA (untere Lauffront) und Zunahme der Komplexbande (obere Lauffront) bei Erhöhung der Proteinkonzentration gezeigt.

Die unterschiedlichen CycT1-Tat-TAR Komplexe wurden in Kristallisationsassays eingesetzt. Aktuell wurden für einen Komplex aus einem neuen Proteinkonstrukt CycT1 (1-272)-eqTat (1-69) und einer 22 nt RNA Kristallisationsbedingungen gefunden, die Kristalle mit verbesserten Diffraktionseigenschaften erzeugten. Die Experimente zur Kristallisation des ternären Komplexes mit den modifizierten RNA Konstrukten finden in Zusammenarbeit mit Dr. Kanchan Anand und Dr. Klaus Scheffzek, EMBL Heidelberg, statt. Derzeit wird intensiv versucht, die Auflösung der Protein/RNA Kristalle auf der Ebene der Kristallisation, im speziellen durch unterschiedliche Cryomethoden, zu verbessern.

4.8 Kristallstruktur der Cyclin-Boxen in Cyclin T1

Im Verlauf der Studien zur Kristallisation des RNA/Proteinkomplexes gelang es, die Kristallstruktur der N-terminalen Cyclin-Boxen in CycT1 (1-263) aufzuklären. Die Strukturklärung fand ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. Kanchan Anand, EMBL Heidelberg, statt. Die Struktur der CycT1-Cyclinboxen gibt Einblicke in den Mechanismus der Regulation der Transkriptionselongation durch P-TEFb und zeigt mögliche Bindungsoberflächen für Cdk9, Hexim1, 7SK snRNA und Tat/TAR.

4.8.1 Darstellung und Kristallisation der Cyclin T1 Proteinkonstrukte

Der N-Terminus in CycT1, im Speziellen die Cyclinbox Wiederholungssequenz (30-250), besitzt unter den Cyclinen die höchste Homologie zu Cyclin H (20% Sequenzidentität). Die N- und C-terminalen Helices jedoch, welche die Cyclinboxen umschließen, weisen im Unterschied zu diesen geringe Sequenzähnlichkeiten auf. Das Vorhandensein der angrenzenden Helices für CycT1 konnte deshalb nicht verlässlich vorhergesagt werden und es wurden vier Konstrukte mit verschiedenen Termini generiert: CycT1 (1-272), (1-281), (1-292) und (29-281), von denen das N-terminal verkürzte Fragment in einem unlöslichen Protein resultierte. Unter den anderen drei löslichen Proteinen war das mittlere Fragment das stabilste. Im Verlauf der biochemischen und kristallographischen Versuche degradierte das Protein jedoch und zeigte Tendenzen, Aggregate zu bilden. Um diese Eigenschaften zu umgehen, sollte zur Stabilisierung des Proteins wieder ein Fusionskonstrukt mit dem Tat Protein hergestellt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese beiden Partner bei der Bindung einen intermolekularen Zinkfinger ausbilden und so die Faltung des CycT1 stabilisieren (Garber et al., 1998). Zur Fusion wurde das EIAV Tat Protein C-terminal über einen 20 Aminosäuren langen Glycin-reichen Linker an CycT1 gehängt. Die resultierende Chimäre aus humanem CycT1 und equine Tat ergab tatsächlich ein stabileres Protein, das weniger anfällig gegenüber Degradation und Aggregation war und bis zu 20 mg/ml konzentriert werden konnte.

Kristalle des CycT1-eqTat Proteins wurden am EMBL Heidelberg durch die Hanging Drop Methode gezüchtet und die Struktur konnte mit einer Auflösung von bis zu 2.7 Å bestimmt werden. Mit analytischen Methoden wurde die Integrität des Fusionsproteins im Kristall überprüft. Es konnte mit MALDI-MS gezeigt werden, dass die Masse des Proteins im rückgelösten Kristall dem volllängen Protein entsprach und keine Degradation aufwies.

4.8.2 Struktur der CycT1 Cyclin-Boxen

Humanes CycT1 besitzt eine konservierte, N-terminale Cyclindomäne mit zwei kanonischen Cyclinboxrepeatstrukturen und zwei angrenzenden N- und C-terminalen Helices. Die mittlere Region ist in allen bekannten T-Typ Cyclinen weniger konserviert, besitzt aber laut Strukturvorhersagen ein helikales Segment (coiled coil Region) und ein hoch konserviertes Histidin-reiches Segment. Die C-terminalen 20 Reste sind Prolin-reich (Abb. 24A).

Die N-terminale Domäne der Cyclin-Boxen in CycT1 bildet ein elongiertes Molekül (Abb. 24B) mit zwei charakteristischen α -helikalen Repeatstrukturen, von denen jede aus fünf Helices besteht (H1-H5 und H1'-H5'). Die erste Cyclinbox in CycT1 entspricht der typischen N-terminalen Cyclinbox, die einen hohen Grad an Sequenzkonservierung und eine konservierte Cdk-Bindungsfläche aufweist. Im Gegensatz dazu beinhaltet die zweite Wiederholungssequenz einige spezielle Bereiche, die einzigartig für T-Typ Cycline zu sein scheinen. Von großer Wichtigkeit scheint ein neun Aminosäuren langes Insert zwischen Helix H3' und H4' zu sein. Diese Region verursacht eine ausgestreckte Schleife, die große aromatische Reste an Positionen W207, W210, H220, W221 und W222 beherbergt. Zusätzlich besteht ein elf Aminosäuren langes Insert zwischen Helices H4 und H5 und eine verkürzte Helix H1' im Vergleich zu Cyclin H (vgl. das Strukturalignment in Abb. 25). Die Interaktionsfläche der zwei Cyclin-Boxen wird von Resten der Helices H1 und H2 gebildet, die hauptsächlich mit Resten der Helix H2' unter Ausbildung eines antiparallelen Drei-Helix-Bündels interagieren.

Im Gegensatz zur hohen Konservierung der kanonischen Cyclinboxrepeatstruktur in allen Cyclinen, unterscheiden sich die N- und C-terminalen Helices in den verschiedenen Cyclinen stark voneinander. Die Existenz und Konformation der N- und C-terminalen Helices spielt eine Rolle in der Spezifität und Aktivität eines Cyclins. CycT1 besitzt eine kurze N-terminale Helix (H_N , 16-20), die unterhalb des ersten Repeats der Cyclinbox liegt und durch Interaktion mit den Resten 72-78 der Verbindungsschleifen zwischen H2 und H3 fixiert wird. Diese Konformation ist ähnlich der in Cyclin H (Abb. 24C), obwohl Cyclin H's N-terminale Helix 16 Reste länger ist als H_N in CycT1. Die C-terminale Helix (H_C , 250-260) bildet zur N-terminalen Helix eine fast senkrechte Anordnung und unterscheidet sich stark von der C-terminalen Helix in Cyclin H, die sich in unmittelbarer Nähe der Helix H_N auf dem ersten repeat befindet. Die Helix H_C in CycT1 kommt auf der Bindungsfläche der beiden repeats zu liegen. Die unterschiedlichen Anordnungen der N- und C-terminalen Helices der strukturell bestimmten Cycline sind in Abbildung 24D dargestellt. Die Cyclinbox-Struktur (1-263), welche die beiden terminalen Helices mit einschließt, bildet in der Überlagerung mit Cyclin H (Andersen et al., 1997; PDB 1JKW) den kleinsten RMSD Wert unter den strukturell charakterisierten Cyclinen von 2.27 Å für die C_α -Kette (Abb. 24C). Die Überlagerung wurde mit dem Programm COOT (Krissinel and Henrick, 2004) erstellt.

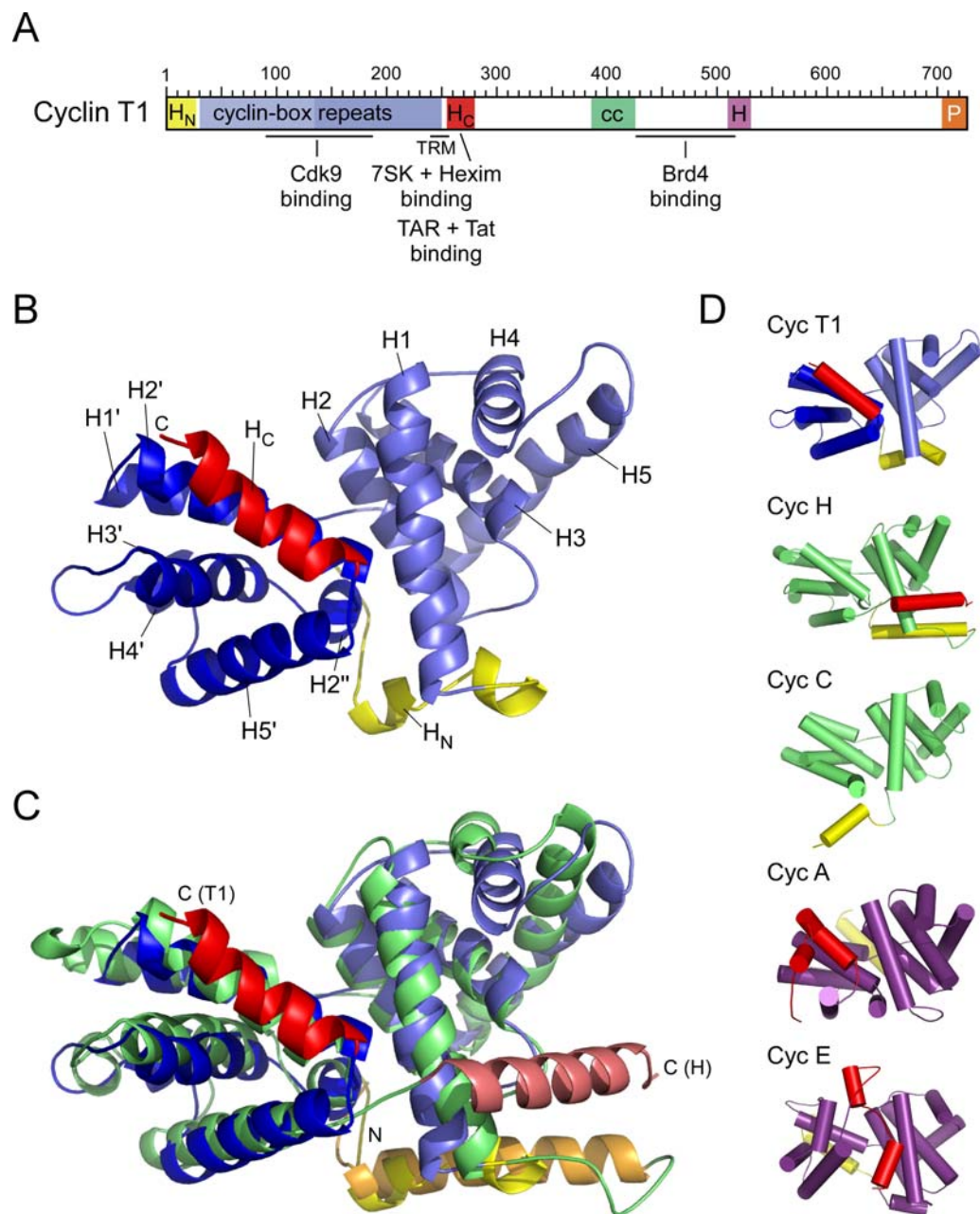


Abbildung 24: Struktur der Cyclin-box Domäne von Cyclin T1. **(A)** Schematisches Diagramm der modularen Domänenorganisation des humanen CycT1. Die konservierte, N-terminale Cyclindomäne besitzt zwei kanonische Cyclin-boxrepeatstrukturen und angrenzende N- und C-terminale Helices. Die mittlere Region besitzt laut Strukturvorhersagen ein helikales Segment (coiled coil Region) und ein hochkonserviertes Histidin-reiches Segment. Die C-terminalen 20 Reste sind Prolin-reich. Vermutete Regionen von CycT1-bindenden Proteinen und RNA Elementen sind an den entsprechenden Interaktionsstellen angegeben. **(B)** Struktur der Cyclin-Boxen in CycT1. Die Helices der zwei Cyclin-boxen (H1-H5 und H1'-H5') sind in blau dargestellt, die N- und C-terminalen Helices H_C und H_N sind gelb bzw. rot gezeichnet. **(C)** Superposition von CycT1 mit Cyclin H (RMSD Wert der C_{α} s = 2.27 Å). Cyclin H ist in grün dargestellt, für CycT1 wurde der gleiche Farbcode wie in (B) benutzt. **(D)** Vergleich verschiedener Cyclinstrukturen: Cyclin T1 (diese Arbeit), Cyclin H (1JKW), C (1ZP2), A (1FIN) und E (1W98). Die Cycline werden anhand ihres Typs grün (C-Typ) oder violett (A-Typ) dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Cycline so positioniert, dass Helices H2 und H1' in etwa die gleiche Lage annehmen.

Ein strukturbasiertes Alignment der Cyclin-Boxen der Cycline A, E, C und H im Vergleich zu verschiedenen Cyclin T's zeigt die Unterschiede in Länge der individuellen Helices und Ähnlichkeiten in der Sequenzkomposition (Abb. 25). Die verschiedenen eukaryotischen Cyclin T's weisen unterdessen eine sehr hohe Konservierung innerhalb der Cyclin-Boxen auf.

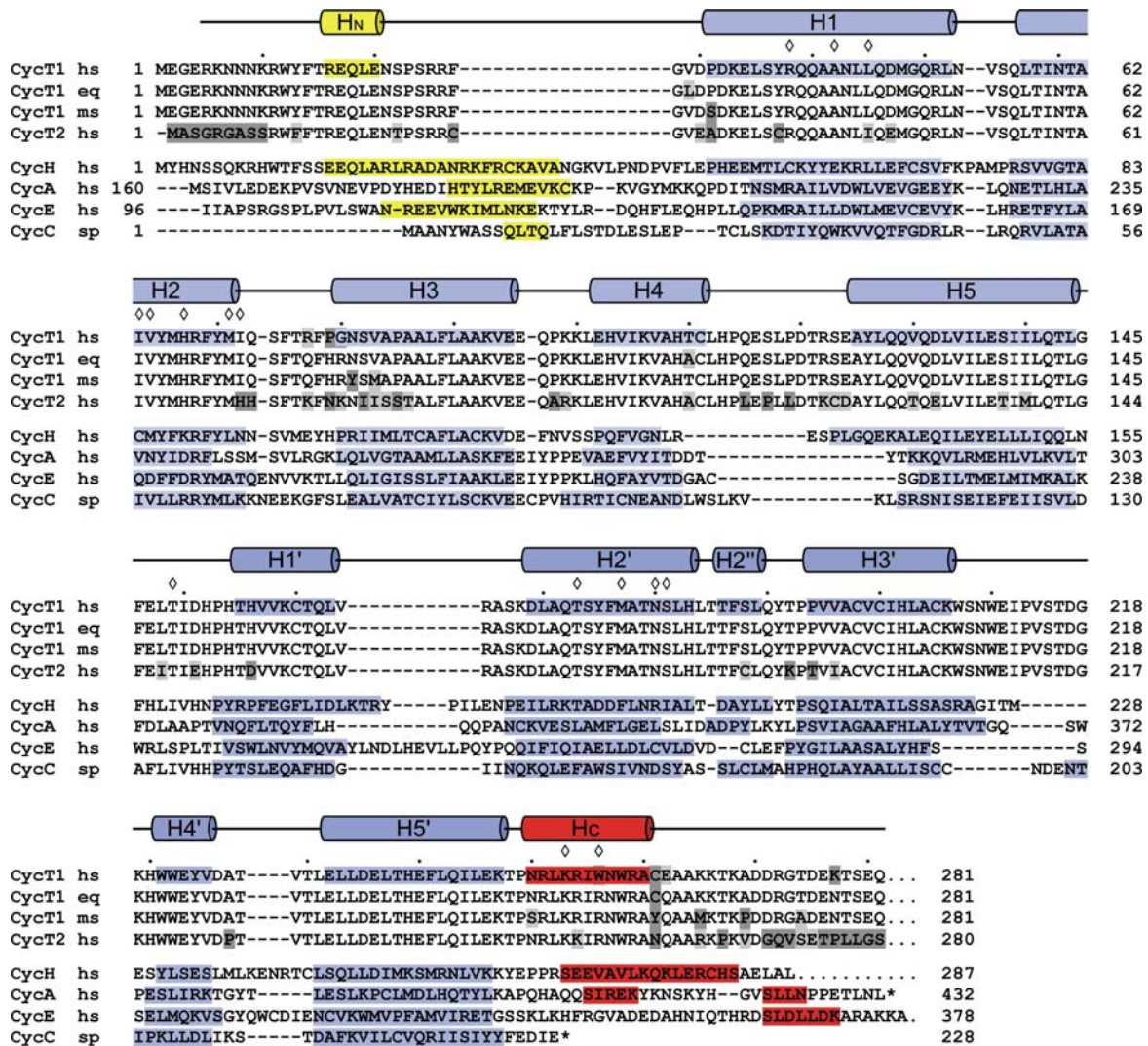


Abbildung 25: Strukturbasiertes Sequenzalignment der Cyclin-Boxen verschiedener Cycline. Im oberen Teil sind verschiedene eukaryotische Cyclin T's dargestellt, die eine hohe Konservierung aufweisen. Die wenigen Reste, die von der Konsensussequenz abweichen, sind grau unterlegt. Der zweite Teil des Alignments basiert auf den Strukturen des humanen Cyclin H (Andersen et al., 1997), des humanen Cyclin A (Jeffrey et al., 1995), des humanen Cyclin E (Honda et al., 1998) und des Cyclin C von *S. pombe* (Hoepfner et al., 2005) und humanes CycT1 (vorliegende Arbeit). Sekundärstrukturelemente von CycT1 sind oberhalb des Alignments gekennzeichnet und die Helices von Cyclin H, A, E und C werden durch Balken dargestellt, wobei die N- und C-terminalen Helices wieder gelb und rot gekennzeichnet sind.

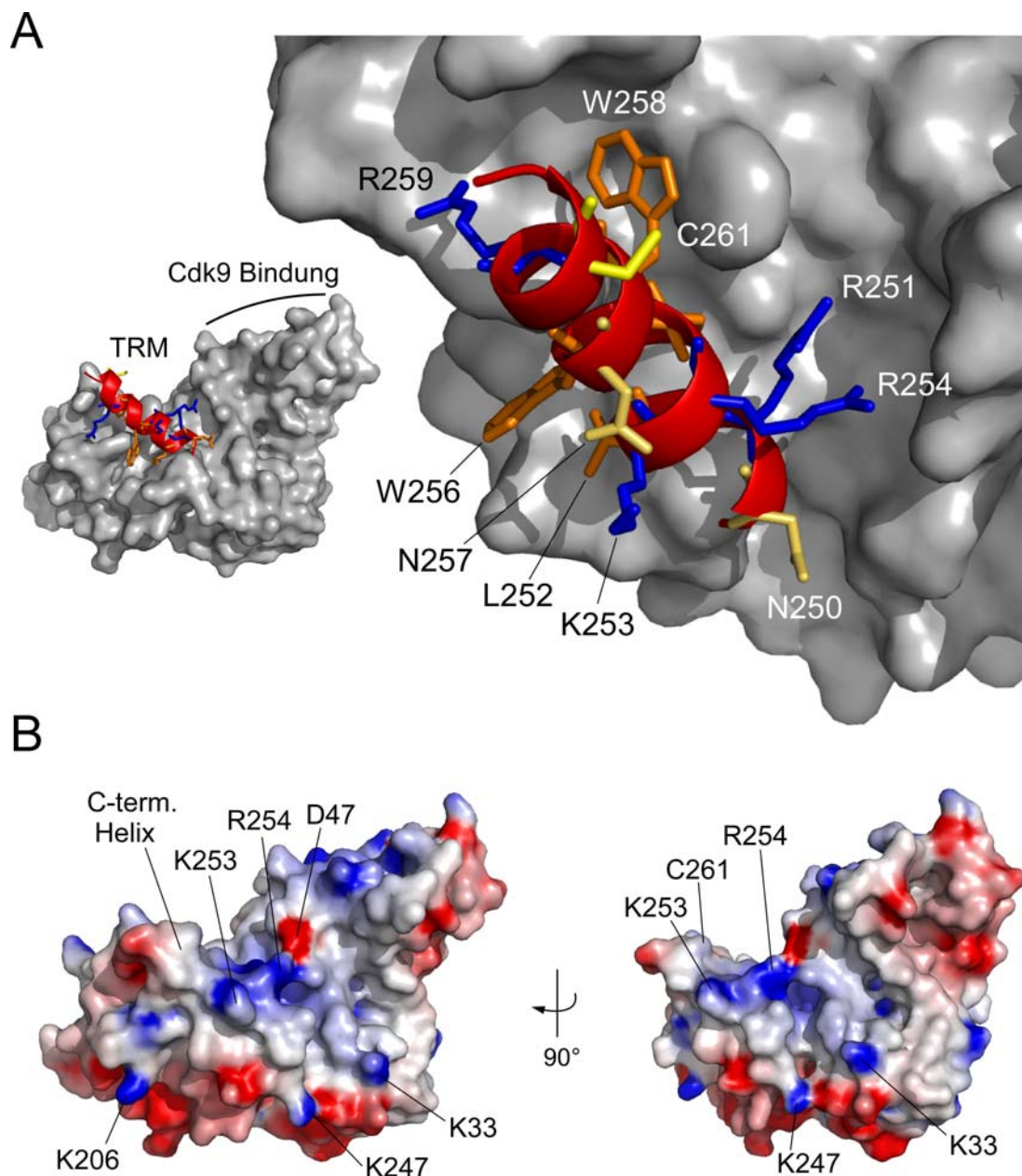


Abbildung 26: Darstellung des Tat/TAR Erkennungsmotivs (TRM) und der elektrostatischen Oberfläche der Cyclin-Boxen. (A) Die an der Tat/TAR Bindung beteiligten Reste des TRM sind auf der Helix H_C hervorgehoben. Positive Reste sind blau, hydrophobe orange und C261 gelb gefärbt. **(B)** Darstellung des elektrostatischen Potentials ($-8 k_B T$ bis $+8 k_B T$) auf der Oberfläche der Cyclin-Boxen von CycT1 (kalkuliert mit GRASP; Nicholls, Sharp and Honig, 1991).

Interaktion zwischen CycT1 und viralem Tat

Die Struktur des Tat/TAR Erkennungsmotivs (TRM, 250-262) ist in Abb. 26 dargestellt. Die konservierten Reste W247, N250, R251, L252, K253, R254, I255, W256, W258, R259 und C261 können potentiell mit dem Tat Protein und der TAR RNA assoziieren. Der Beitrag der einzelnen Reste innerhalb des TRM in CycT1 zu der Bindung und Aktivierungseigenschaft zu HIV-1 Tat und TAR sind in einer Studie von Garber et al. (1998) detailliert analysiert worden. Es wurde gezeigt, dass die Reste N250, R259 und C261 in die Tat Bindung involviert sind und die Aminosäuren R251,

L252, R254, I255 und W258 eine Rolle in der TAR RNA Bindung haben. In der hier bestimmten CycT1 Struktur ist zu erkennen, dass die Reste R251 und R254 nicht an der Oberfläche liegen, sondern mit Resten in der Nähe der Interaktionsfläche der beiden repeats interagieren. Im Gegensatz dazu sind die Aminosäuren K253, W256 und R259 auf der Oberfläche exponiert, die nicht in Tat/TAR Interaktion involviert sein sollen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Mutationen der Reste R251 und R254 in der Studie von Garber et al. zu Konformationsänderungen der Helix H_C führten, die Bindung an Tat-TAR nicht mehr zuließen. In dieser Annahme wären die Interaktionen dieser Reste für die Erhaltung einer aktiven Konformation notwendig. Möglicherweise müssen aber auch vor der Bindung von Tat und TAR an CycT1 Konformationsänderungen eintreten, die diese Reste zugänglich machen. Unterstützt wird diese Annahme von der Existenz einer basischen Tasche, an dem neben den positiven Ladungen des TRM auch Reste der Helix H1 beteiligt sind (Abb. 26B). Diese könnten als repulsive Kräfte die Helix H_C in eine geöffnete Konformation drängen, so dass die Reste R251 und R254 Tat oder TAR binden. Vorhergehende Untersuchungen zur Bindung des humanen CycT1 im Vergleich zum Maus CycT1 (Garber et al., 1998) haben gezeigt, dass CycT1 für die Species spezifischen Restriktionen der HIV-1 Tat Transaktivierung *in vivo* verantwortlich ist. Maus CycT1 besitzt an der Position C261 ein Tyrosin. Deshalb kann HIV-1 Tat nicht kooperativ mit murinem CycT1 an die TAR RNA unter Ausbildung eines Zinkfingers binden, jedoch können TAR-RNA Bindung und Tat Transaktivierung durch Expression von humanem CycT1 oder murinem CycT1 mit der Mutation Y261C im TRM (Fujinaga et al., 1999) wieder hergestellt werden.

4.8.3 Implikationen des Tat-CycT1 Fusionsproteins für die Transaktivierung

Da in der Kristallstruktur des CycT1-Tat Fusionsproteins das eqTat Protein keine definierte Struktur annimmt (Abb. 27), sollte in Funktionalitätsassays die Fähigkeit zur Bindung an TAR überprüft werden. In einem elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstest (EMSA) konnte die Bindung des Fusionsproteins an EIAV TAR RNA gezeigt werden. Dazu wurde ein 30-mer RNA Konstrukt *in vitro* transkribiert und die Bindung der RNA an das Fusionsprotein in einem nichtdenaturierenden Acrylamidgel über UV Visualisierung der RNA detektiert (Abb. 28).

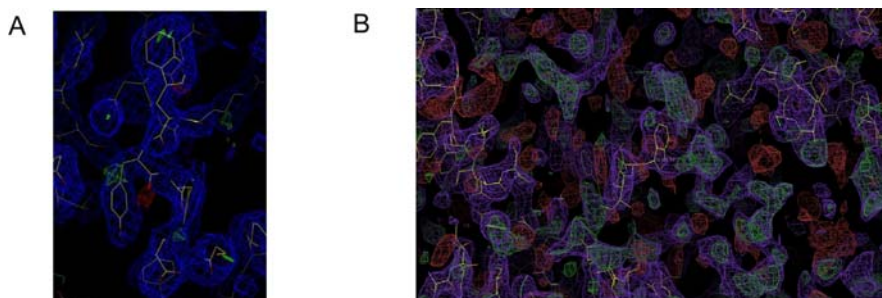


Abbildung 27: Das eqTat Protein nimmt im Kristall keine definierte Struktur an. (A) Beispielhaft ist hier ein Ausschnitt aus der 2IFol - IFcl Composite-Omit Mappe (Programm O, Jones and Kjeldgaard, 1991) für CycT1 dargestellt, wobei die Struktur gut definiert ist. **(B)** Im Gegensatz dazu zeigt die Differenzdichte (grün), dass das eqTat Protein im Kristall keine definierte Struktur annimmt.

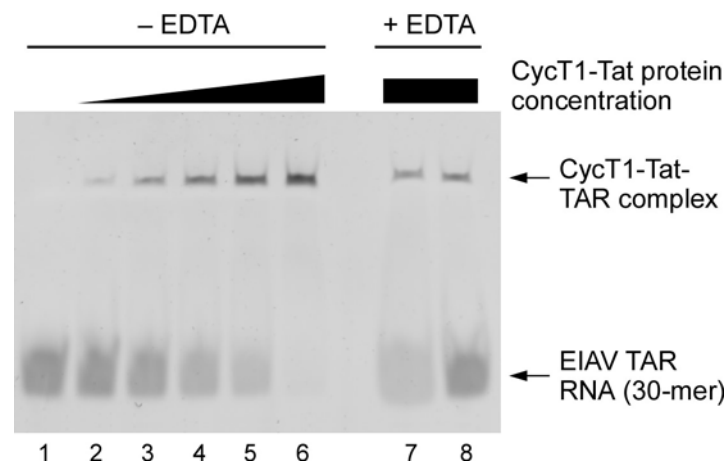


Abbildung 28: Bindung des CyclinT1-eqTat Fusionsproteins an TAR. EMSA mit CycT1-eqTat Fusionsprotein und EIAV-TAR. Die Konzentrationen der 30 nt RNA wurde in jedem Ansatz mit 2 μ M konstant gehalten, wobei die CycT1 Konzentration stufenweise anstieg (0.5-5 μ M). Die Ansätze wurden analog der EMSA Untersuchungen in Abb. 23 behandelt. CycT1-Tat-TAR-Komplexbildung ist durch Abnahme der Bande der isolierten RNA (untere Lauffront) und Entstehen der Komplexbande (obere Lauffront) bei Erhöhung der Proteinkonzentration zu erkennen (Spuren 1-6). In den Spuren 7 und 8 wurde das Fusionsprotein vor RNA Zugabe 30 min lang mit EDTA inkubiert. Eine verminderte Komplexbildung wird trotz gleicher Konzentrationen wie in Spur 6 erkennbar.

Spezifische Komplexbildung wird erkennbar in dem Migrationsshift der komplexierten RNA verglichen mit freier RNA. Durch ansteigende Konzentrationen des Fusionsproteins wird mit diesem Fusionsprotein eine vollständige Komplexbildung der eingesetzten RNA erreicht (Abb. 28, Spuren 1-6). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Komplexbildung durch Zugabe von EDTA reduziert werden kann. Wird die CycT1-eqTat Proteinlösung vor RNA Zugabe mit Überschuss EDTA inkubiert, ist eine schwächere CycT1-eqTat TAR Interaktion nachzuweisen (Spuren 7, 8). EDTA komplexiert divalente Kationen und könnte so die Bildung des Zinkfingers inhibieren. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis für die spezifische Komplexbildung zwischen CycT1-Tat und TAR. Die Bildung des intermolekularen Zinkfingers zwischen CycT1 und Tat scheint für eine hochaffine TAR Interaktion notwendig zu sein. Die Fähigkeit zur TAR Interaktion wird allerdings durch EDTA nicht vollständig aufgehoben, sondern nur abgeschwächt. Zusammenfassend zeigt der Mobilitätsverschiebungstest, dass das bakteriell exprimierte CycT1-eqTat Fusionsprotein einen spezifischen Komplex mit EIAV TAR RNA eingehen kann, der durch die Bildung eines intermolekularen Zinkfingers beeinflusst wird. Das Tat Protein nimmt vermutlich erst nach Ausbildung des vollständigen ternären Komplexes eine definierte Struktur an. Somit scheint zur Strukturbestimmung des Tat Proteins die Bindung an die RNA notwendig zu sein. In Lösung als isoliertes Protein liegt das Tat Protein vermutlich unstrukturiert vor. Die Ergebnisse der EMSA Studien sind im Einklang mit vorhergehenden Studien in murinen Zellen, welche die Transaktivierungsfähigkeit von CycT1-Tat Chimären *in vivo* zeigen konnten (Fujinaga et al., 2002b).

III. Strukturelle Charakterisierung der N-terminalen Region des humanen Forminproteins FHOD1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Studie durchgeführt, die sich thematisch vom Hauptthema abgrenzt, methodisch aber ergänzt. Dieser Teil behandelt die Strukturbestimmung des humanen Forminproteins FHOD1 mittels Röntgenkristallographie. Im Folgenden soll zunächst in das Thema eingeführt und anschließend die Ergebnisse dargestellt werden.

4.9 Regulation der Aktinnukleierung durch FHOD1

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus drei miteinander verbundenen Netzwerken: Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Zusammen bilden sie das Zellgerüst, das durch dynamische Regulation einem ständigen Auf- und Abbau unterlegen ist. Für die Aktinfilamente wird dieser Umbau hauptsächlich durch den Arp2/3 Komplex und der erst vor kurzem entdeckten Familie der Forminproteine katalysiert (Waller and Alberts, 2003). Beide Komplexe organisieren unterschiedliche Aktinstrukturen, wobei der Arp2/3 Komplex die Polymerisation von verzweigten Filamenten katalysiert und Formine im Gegensatz dazu die Assemblierung von unverzweigten Aktinfilamenten nukleieren.

Aktin existiert in der Zelle in zwei Zuständen: das globuläre Aktinmonomer (G-Aktin) und filamentöses Aktin (F-Aktin). Die Zelle unterhält einen großen Vorrat an Aktinmonomeren, die ATP-gebunden und mit Profilin assoziiert vorliegen. Aktinpolymerisation ist thermodynamisch favorisiert und unter physiologischen Bedingungen lagern sich Aktinmonomere unter ATP-Hydrolyse spontan zusammen. Dabei entstehen polare Aktinfilamente mit einem schneller wachsenden stumpfen Ende (Plus) und einem langsamer wachsenden spitzen Ende (Minus). Diese traditionellen Bezeichnungen entstanden aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Aktinfilamente, die eine pfeilförmige Struktur zeigen, wenn sie mit Myosin im Komplex vorliegen (Holmes et al., 1982; ISHIKAWA.H et al., 1969).

Im Kontext der Zelle ist allerdings eine hochkontrollierte und regulierte Nukleierung des Aktins erforderlich, um die verschiedenen komplexen Funktionen des Aktinzytoskeletts zu erfüllen. Zellpolarität, Zellmigration, Zytokinese, vesikulärer Transport und die Bildung von Membranausläufern sind nur einige der zellulären Prozesse, die von Aktinfilamenten abhängen. Eine wichtige Klasse der spezifischen Nukleierungsproteine sind die Forminproteine. Aufgrund ihrer zentrale Rolle in der Nukleierung unverzweigter Aktinfilamente sind Formine wiederum in einer Vielzahl von zellulären Funktionen von Bedeutung, wobei die diversen zellulären Funktionen der Formine stark von den jeweiligen Regulations- und Interaktionspartnern abhängen und weniger von ihrem Nukleierungsmechanismus, der bei allen bisher charakterisierten Forminen konserviert ist (Faix and Grosse, 2006).

Formine bilden eine Familie von ubiquitären Multidomänenproteinen. Gemeinsam haben sie eine hochkonservierte, zumeist C-terminale FH2 („formin homology“) Domäne, an die sich N-terminal eine Prolin-reiche FH1 Domäne anschließt (Castrillon and Wasserman, 1994). Die 40 kDa

große FH2 Domäne stellt die katalytische Domäne der Formine dar und polymerisiert Aktinfilamente am stumpfen Ende des Aktinpolymers (Kovar et al., 2003). Die FH1-Domäne bindet an Profilin und ermöglicht so eine Rekrutierung von Aktinmonomeren in die Nähe der FH2 Domäne (Chang et al., 1997). Bei der Elongation des Filaments bleibt das Formin am stumpfen Ende gebunden und fügt ständig neue Aktinmonomere ein (Higashida et al., 2004; Kovar and Pollard, 2004). Fast gleichzeitig wurden 2004 zwei dreidimensionale Strukturen einer FH2 Domäne bestimmt. In der Struktur einer FH2 Domäne aus Hefe (Bni1p) konnte gezeigt werden, dass die Domäne einen flexiblen Dimer bildet, der aus zwei verlängerten Aktin bindenden Motiven besteht (Xu et al., 2004). Eine flexible N-terminale Region (lasso, linker) interagiert dabei mit der C-terminalen Unterdomäne des jeweils anderen Moleküls wechselseitig, um so einen gegenläufigen Dimer zu bilden. Die Kristallstruktur einer monomeren FH2 Domäne aus murinen mDia1 ließ erkennen, dass die für die Dimerisierung verantwortlichen Motive für die Aktinnukleierung essentiell sind (Shimada et al., 2004). Zusammen mit Aktinnukleierungsexperimenten wurde ein Modell erstellt, in dem die FH2 Domäne sich prozessiv mit dem wachsenden Ende des Aktinpolymers bewegt. Ein Jahr später wurde die Kristallstruktur eines Komplexes aus Aktinmolekülen, die an die FH2 Domäne binden, gelöst (Otomo et al., 2005). Nach einem neuen Modell könnte das FH2-Dimer zwischen einer offenen und geschlossenen Form wechseln und so das Einfügen eines neuen Monomers ermöglichen bzw. ausschließen (Vavylonis et al., 2006). Der katalytische Mechanismus der Aktinnukleierung durch Formine ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Eine Untergruppe der Formine bilden die „Diaphanous“ verwandten Formine (DRF's), die Effektoren für Rho-GTPasen bilden. Namensgebend für die DRF Familie war das homologe *drosophila* Protein DIAPHANOUS (Wasserman, 1998). Diese Gruppe von Forminen zeichnet sich durch autoinhibitorische Eigenschaften und spezifische Aktivierung durch aktive Rho-GTPasen aus. Die Autoinhibierung wird durch eine sehr kleine Region im C-Terminus vermittelt, der Diaphanous-autoregulierten Domäne (DAD), die mit der größeren N-terminalen regulatorischen Domäne assoziiert (Wasserman, 1998; Watanabe et al., 1997). Innerhalb der DAD befindet sich ein regulatorisches, konserviertes Motiv mit der Sequenz MDxLL (Alberts, 2001) und eine konservierte basische Region. Die regulatorische N-terminale Domäne besteht aus einer GTPase-bindenden Domäne (GBD) und einer FH3 Domäne (Wallar and Alberts, 2003). Im autoinhibierten Zustand bindet die DAD den N-Terminus, wodurch das Molekül eine geschlossene Konformation einnimmt und die Aktinnukleierung verhindert wird. Durch Bindung einer aktivierten Rho-GTPase wird die Inhibierung aufgehoben (Alberts, 2001). Die Kristallstruktur von mDia1 in Komplex mit der GTPase RhoA (Rose et al., 2005) konnte erste Hinweise auf den Mechanismus der Inhibierung geben. Der N-Terminus besitzt eine helikale GBD, die mit der GTPase RhoA assoziiert. Nachfolgend schliesst sich eine Armadillorepeatstruktur an, die im autoinhibitorischen Zustand mit der DAD assoziiert. Die als FH3 Domäne bezeichnete Armadillorepeatstruktur wurde zuerst 1998 als eine repetitive Faltung von Petersen et al. erkannt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Bindung von RhoA an die GBD zu Konformationsänderungen führt, die nachfolgend die Freisetzung der DAD induziert (Lammers et al., 2005; Nezami et al., 2006). Für die vollständige Aktivierung *in vivo* sind zusätzlich jedoch noch bisher unbekannte Faktoren notwendig (Li and Higgs, 2005).

Rho GTPasen gehören zur Ras- (Ratten-Sarcoma-Onkogen) Superfamilie der GTP-bindenden Proteine und sind für ihre bestimmende Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts bekannt. Die prominentesten Vertreter innerhalb dieser Familie sind Rho- (Ras Homologieprotein), Rac- (Ras- verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat) und Cdc42- („cell division cycle“) Proteine. Die herausragende Eigenschaft der GTPasen durch einen GDP- oder einen GTP-gebundenen Zustand zwei verschiedene Konformationen einzunehmen, macht sie zu einem molekularen Schalter (Bourne et al., 1990). Im aktiven Zustand interagieren Rho GTPasen mit ihren Effektoren, welche in diesem Fall die Diaphanous verwandten Formine sind. Konstitutiv aktive Rho Proteine führen in Zellen zur unkontrollierten Ausbildung von Aktinfilamenten, wobei im speziellen Rho Stressfaserbildung induziert, Rac Lamellipodien- und Cdc42 Filopodienbildung stimuliert.

Das humane FHOD1 Protein („Formin homology domain 1 containing protein“) ist ein Mitglied der DRFs. Das Protein ist 1164 Aminosäuren lang, wird ubiquitär exprimiert und ist in Abb. 29 schematisch dargestellt. Ursprünglich trug das Protein den Namen FHOS („Formin homolog overexpressed in spleen“), da es in Milzzellen in sehr großen Mengen exprimiert wird. FHOD1 besitzt den typischen Forminaufbau einer FH1 mit anschließender C-terminaler FH2 Domäne. Wie bei allen DRFs befindet sich am C-Terminus die DAD, die mit dem N-Terminus zur Autoinhibierung interagiert. Auffallend ist die für die FHOD-Familie einzigartige 10 kDa große Region zwischen der FH2 und DAD Domäne, dessen Funktion bisher noch ungeklärt ist (Schonichen et al., 2006). Die für die Aktivierung notwendige GBD ist durch Sequenzvergleich zu anderen DRF's in FHOD1 nicht zu identifizieren (Boehm et al., 2005; Peng et al., 2003; Westendorf, 2001). Jedoch ist gezeigt worden, dass die Rho Familie GTPase Rac1 unabhängig vom Nukleotidzustand in der mittleren Region des Proteins binden (Gasteier et al., 2003) und das FHOD1 Protein aktivieren soll (Westendorf, 2001). Durch Deletion des C-Terminus konnte die Autoinhibierung in FHOD1 ebenfalls aufgehoben werden. Dadurch ist FHOD1 konstitutiv aktiv und induziert in Zellen breite Stressfasern (Gasteier et al., 2003; Westendorf, 2001).

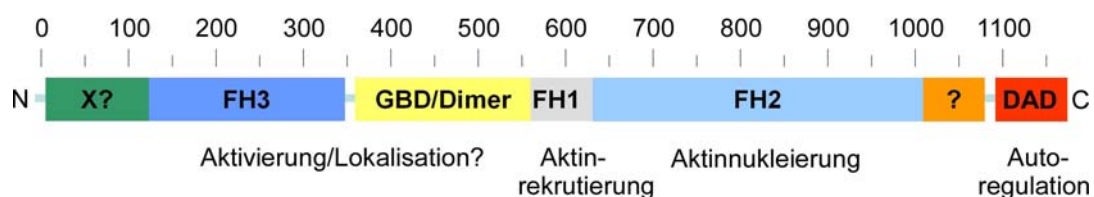


Abbildung 29: Schema der vermuteten Domänenstruktur von FHOD1. N-terminal befindet sich eine FH3 Domäne, die für die Ausbildung von Protein-Protein Interaktionen bekannt ist und mit der DAD assoziieren soll. Eine zentrale GBD wurde als Rac1-bindende Domäne charakterisiert, die auch eine Dimerisierungsfunktion besitzen soll. Es schließt sich eine FH1 Domäne an, die mit Profilin und Aktin interagiert, gefolgt von der katalytischen FH2 Domäne. C-terminal besitzt FHOD1 eine autoregulatorische Domäne (DAD). Dazwischen befindet sich eine Region mit noch unbekannter Funktion. Die bisher zugeordneten Funktionen bestimmter Proteindomänen sind unterhalb des Proteins benannt.

4.10 Darstellung und Kristallisation der N-terminalen FHOD1 Proteinkonstrukte

In Studien zur Analyse des autoinhibitorischen Mechanismus des FHOD1 Proteins, die in unserem Labor von André Schönichen durchgeführt wurden, stellte sich in Expressionsstudien heraus, dass der N-terminale Bereich des Proteins als stabiles, lösliches Protein gereinigt werden konnte. Dieser Bereich des Proteins, der vermutlich in den autoinhibitorischen Prozess involviert ist, sollte nun mit kristallographischen Methoden strukturell untersucht werden. Für die Kristallisation des N-terminalen Bereichs des FHOD1 Proteins wurden die im Folgenden beschriebenen Fragmente hergestellt, und die löslichen und stabilen Konstrukte in verschiedenen Kristallisationscreenings eingesetzt. Die untersuchten Fragmente sind in Abb. 30 dargestellt und die erzielte Reinheit des Fragments FHOD1-U1 ist exemplarisch in Abb. 31A gezeigt. Die Klonierung, Expression und Reinigung ist im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben. Hier wird kurz auf die Löslichkeit, Degradationseigenschaften und Reinheitsgrade der unterschiedlichen Konstrukte eingegangen.

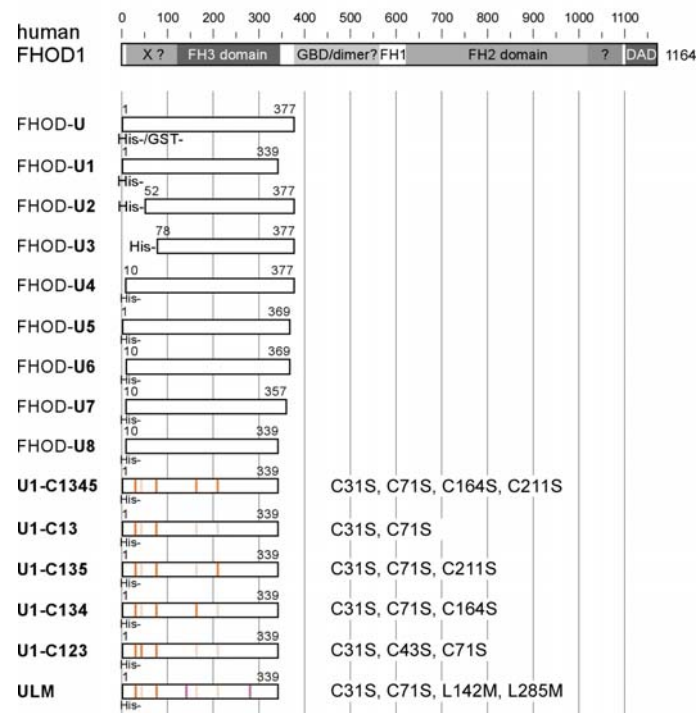


Abbildung 30: Darstellung der für die Kristallisationsstudie hergestellten N-terminalen Konstrukte von FHOD1. Die Zahlen geben die Fragmentgrenzen in der Proteinprimärsequenz an. Die N-terminal verkürzten Konstrukte FHOD-U2 und U3 waren unlöslich, ebenso ergab unter den Cystein Mutanten auch nur das Konstrukt C13 ein lösliches Protein. Die Konstrukte, die bei Aminosäure 10 beginnen, tragen einen nicht abschneidbaren Histidinanker. Das Fragment ULM, das auf der Mutante C13 basierte, wurde mit zwei Methioninmutationen für Selenomethioninexpression eingesetzt.

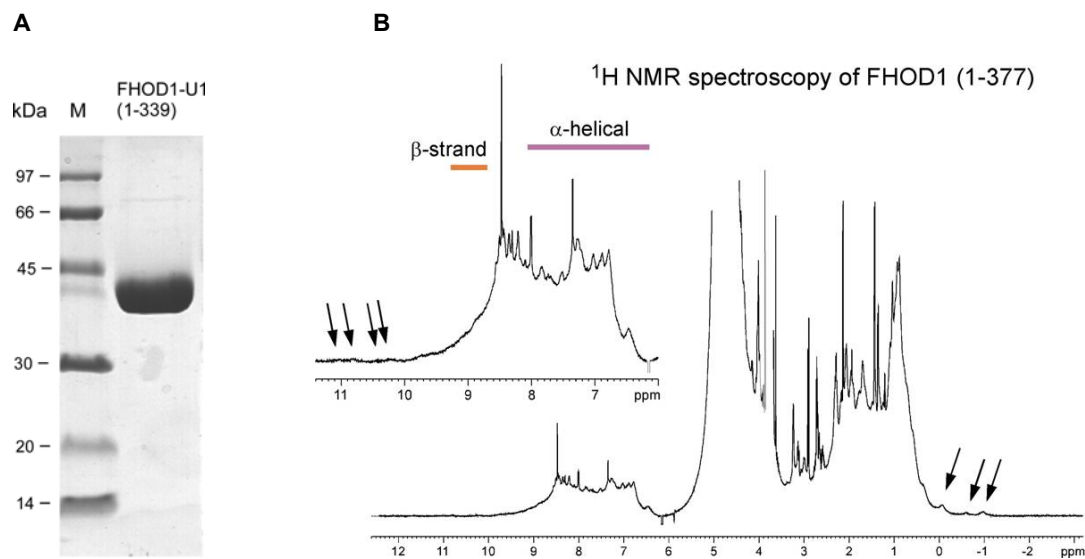


Abbildung 31: Charakterisierung der N-terminalen Region (1-377) von FHOD1. (A) Illustration der Reinheit der für die Kristallisation eingesetzten FHOD1 Konstrukte. Es wurden exemplarisch 5 µg des FHOD1-U1 Proteins auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen, welches einen hohen Reinheitsgrad (>98%) aufwies und bei der erwarteten Größe von 41 kDa lief. (B) Protonenspektrum des N-terminalen FHOD1-U Konstrukts (1-377). Das Spektrum zeigt eine hohe Dispersion der Resonanzsignale. So weisen vor allem die Signale im NH-Bereich auf eine α -helikale Faltung mit weiteren Anteilen eines β -Faltblatts, hin. Trotz seiner Größe von 41 kDa weisen die Hochfeld-verschobenen Signale im Bereich unterhalb von 0 ppm auf ein globuläres, monomeres Protein hin. Diese Signale (Pfeile) rühren vermutlich von Methylgruppen innerhalb des Moleküllerns her.

Alle Konstrukte wurden über einen Histidinanker gereinigt. Ein erstes stabiles Konstrukt (1-377) wurde testweise mittels NMR Spektroskopie analysiert, wobei eine stabile Faltung identifiziert werden konnte (Abb.31B). Parallel zu den Kristallisationsansätzen mit diesem Proteinfragment wurden auf den kristallographischen Ergebnissen basierend fortlaufend weitere Fragmente rekombinant hergestellt und wiederum kristallographisch getestet. Die eingesetzten Methoden zur Kristallisation sind im Material- und Methodenteil beschrieben.

Eine erste Kristallisationsbedingung konnte für das Konstrukt FHOD1 U (1-377) gefunden werden (4-5 M NaCl, 0.2 M NaAc, 0.1 M Bicine, pH 9.0, 5 mM DTE). Für das Konstrukt FHOD1-U1 (1-339) konnten unter der gleichen Bedingung Kristalle erzeugt werden, die sich soweit optimieren ließen, dass ein Datensatz mit einer Auflösung bis zu 3,8 Å gemessen wurde (Abb. 32A). Diese Kristalle gehörten zur Raumgruppe C222. Die Kristalle wuchsen innerhalb von zwölf Stunden bis zu einer Größe von 500x300x150 µm. Da es Hinweise auf Dimerisierung des Konstrukts in der Größenausschlusschromatographie gab, wurden Cysteinmutationen eingeführt, die mögliche Disulfidbrückenausbildung verhindern sollten. Ein erstes Konstrukt mit 4 von 5 möglichen Cystein zu Serin Mutationen ergab in Expressionsstudien ein unlösliches Protein. Das einzig lösliche Fragment unter den Cysteinmutanten basierte auf dem Konstrukt FHOD1-U1 und enthielt zwei Cysteinmutationen C31S/C71S. Dieses Fragment kristallisierte als erstes Konstrukt nicht unter den zuvor genannten Hochsalzbedingungen und wurde neuen Kristallisationsscreens unterzogen. Unter

anderen Bedingungen (20-25% PEG 200, 10-15% Glycerol, 0.3 M MgCl₂, 0.05 M Tris/HCl pH 8.0) konnten neue Kristalle erzeugt werden, die dünne, stark anisotrope Plättchen bildeten (Abb. 32B). Unter den gleichen Bedingungen wurden Kristalle der für die Strukturlösung notwendigen Proteinvariante erzeugt, die anstelle der Aminosäure Methionin Selenomethionin enthielt. Die Herstellung dieses Proteins wird ebenfalls im Methodenteil beschrieben. Für einen Kristall des Selenomethionin enthaltenden FHOD1-U1 (C31S/C71S) und für einen nativen Kristall wurden Datensätze aufgenommen, dessen Statistik Tabelle 3 zu entnehmen ist. Die Datenaufnahme erfolgte am SLS Synchrotron. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe P1. Die Refinement Statistik ist ebenfalls in Tabelle 3 dargestellt und die Methoden zur Bestimmung der Struktur werden im Methodenteil genauer beschrieben.

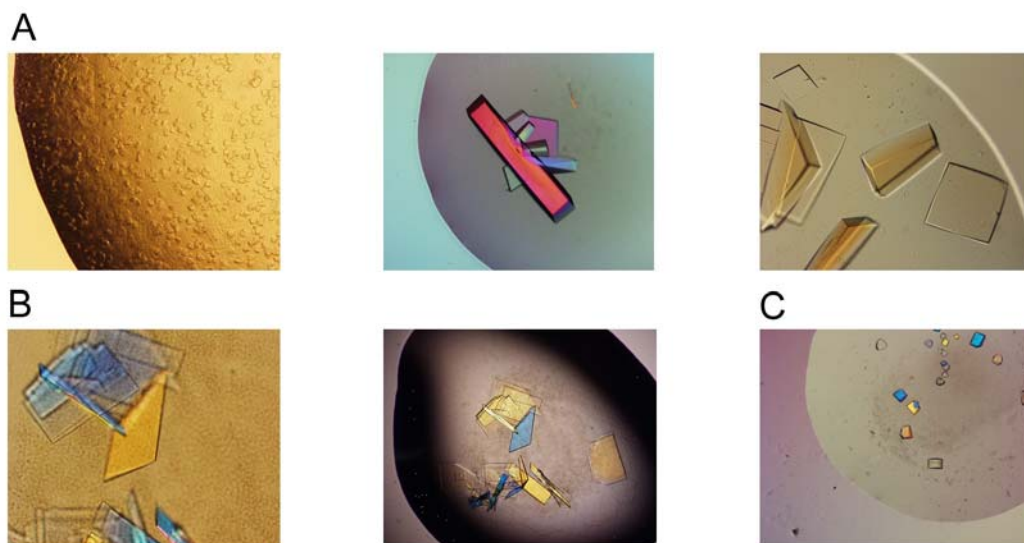


Abbildung 32: Kristallisation der N-terminalen Konstrukte von FHOD1. (A) Kristalle von FHOD1-U1. Diese Kristalle konnten nach initialen kleinen Kristallen durch Seeding und Zugabe verschiedener Additive auf eine Größe von bis zu 500x200x100 μm vergrößert werden. (B) Kristalle des FHOD1-U1-C13 Proteins, die bei unterschiedlichen Bedingungen gezogen wurden. Die anisotropen, sehr dünnen Plättchen haben eine Größe von bis zu 400x300 μm . Diese Kristalle wurden mit nativem und Selenomethionin-Protein hergestellt. (C) Initiale Kristalle des FHOD1-U1/DAD Komplex. FHOD1-U1 (1-339) wurde mit einem synthetisierten DAD-Peptid von 30 Aminosäuren Länge (1104-1133) in einem 1:1 Komplex kokristallisiert.

Tabelle 3: Kristallographische Parameter.**(A) Statistik der Datenaufnahme**

Crystal	Se-Met		Native
Space group	P1		P1
a, b, c (Å); α , β , γ (°)	35.53, 73.38, 79.26; 78.34, 86.11, 89.91		35.44, 73.93, 78.67; 78.24, 86.17, 89.67
Number of molecules in the asymmetric unit	2		
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	2.66		
Solvent content (%)	53.8		
Wavelength (Å)	0.979746 infl. point	0.979508 peak	0.97883
Resolution (Å)	19.9- 2.9	19.9 - 2.9	19.6 - 2.3
No. of reflections	71355	71527	109066
No. of unique reflections	33615	33714	32912
Redundancy	2.12	2.12	3.31
Completeness	96.8(96.5)	97.1(96.5)	94.8(77.8)
R _{merged} (%)	10.0(30.0)	8.7(26.6)	13.9(35)
I/ σ	11.76(3.69)	13.09(4.21)	8.39(3.76)

(B) Statistik des Refinements

Resolution (Å)	19 - 2.3
No. of modelled amino acid residues	632
No. of water molecules	237
R factor (%)	21.9
R _{free} (%)	25.9
r.m.s.d. from ideal geometry bonds (Å)/ angles (°)	0.0064/1.13
Ramachdran plot	
Most favored region (%)	92.9
Additional allowed region (%)	6.9
Generously allowed region (%)	0.2
Disallowed region (%)	0
Average B factors (Å ²)	43

4.11 Kristallstruktur der N-terminalen Region in FHOD1

Die Kristalle des FHOD1 Proteins (1-339) gehörten zur Raumgruppe P1 und enthielten zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit, deren Anordnung zueinander in Abb. 33 dargestellt ist. In der folgenden Strukturdarstellung werden die strukturellen Daten des Moleküls A benutzt, da sie eine höhere Vollständigkeit aufwiesen. Die Struktur der N-terminalen Region ist von Aminosäure 15 bis 339 determiniert, die zwei definierte Domänen beherbergt. Eine α -helikale Struktur am C-Terminus, die eine Armadillo-repeatfaltung bildet und eine N-terminale Domäne, die überwiegend aus β -Faltblättern besteht, eine Ubiquitinsuperfaltung annimmt und funktional als Ras-bindende Domäne (RBD) charakterisiert wird. Auffallend ist, dass auf die erste Domäne direkt die zweite Domäne folgt und die zwei Domänen nicht durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind.

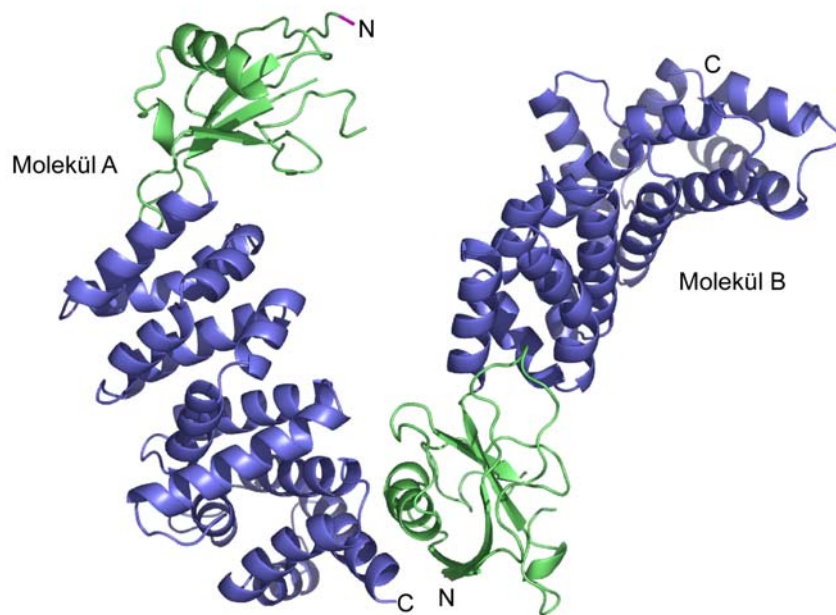


Abbildung 33: Struktur des N-terminalen Bereichs in FHOD1. Die hier dargestellten zwei Moleküle bilden in dieser Anordnung die asymmetrische Einheit. Die Struktur des N-terminalen Bereichs ist von Aminosäure 15 bis 339 determiniert. Das Konstrukt beherbergt zwei Domänen: eine α -helikale Struktur am C-Terminus, die eine Armadillorepeatstruktur annimmt, und eine N-terminale Domäne mit einer Ubiquitinfaltung.

4.11.1 Struktur der FH3 Domäne (116-339)

Zunächst soll hier die C-terminale Domäne des Konstrukts beschrieben werden. Erst anhand der Strukturbestimmung wurde ersichtlich, dass diese Region (116-339) der konservierten FH3 Domäne in Diaphanous verwandten Forminen entspricht. Da diese Region eine Armadillorepeatstruktur bildet, konnte sie als tatsächliche FH3 Domäne definiert werden (Abb.35). In der Kristallstruktur des Forminproteins mDia1 (Rose et al., 2005) wurde gezeigt, dass es ebenfalls eine Armadillo-repeatstruktur besitzt. Im Folgenden soll zunächst die typische Armadillorepeatstruktur und deren Konsensussequenz beschrieben werden (Abb. 34).

Klassifizierung von Armadillorepeatstrukturen

Armadillo- und sogenannte Heatrepeats sind tandemartige Wiederholungssequenzen von ca. 40 Aminosäuren Länge, die in vielen verschiedenen eukaryotischen Proteinen auftauchen (Andrade et al., 2001). Armadillorepeats sind häufig in Protein-Protein Interaktionen involviert. Kristallstrukturen von Armadillorepeats wurden zuerst in β -Catenin (Huber et al., 1997) und Importin α (Conti et al., 1998) gelöst. Sie lassen die kanonische Armadillofaltung erkennen, die aus drei Helices besteht, die mit H1, H2 und H3 bezeichnet werden. Die Helices H2 und H3 lagern sich in einer antiparallelen Art zusammen und fast senkrecht zu ihnen kommt die kürzere Helix H1 zu liegen, wobei ein scharfer Knick zwischen H1 und H2 entsteht, der durch ein konserviertes Glycin ermöglicht wird. Im Unterschied dazu besteht der Heatrepeat aus nur zwei Helices, HA und HB, die eine helikale Haarnadelschleife bilden. In Armadillo- und Heatrepeat-Proteinen werden die benachbarten Repeats über einen kontinuierlichen hydrophoben Kern aneinandergestapelt und bilden so als zusammenhängende Domäne eine elongierte „Superhelix“. In Armadillorepeat Proteinen bildet die Helix H3 eine hochkonservierte, konkave Oberfläche, die häufig als Bindungsstelle für Liganden dient (Conti et al., 1998). Heat Proteine bilden diese mit ihrer Helix HB (Conti and Izaurralde, 2001).

Armadillo- und Heatrepeats teilen beide sieben konservierte hydrophobe Aminosäuren an den Positionen (10/13), (17/24), (28/32/35). Diese hydrophoben Reste bilden eine Leiter von Interaktionen innerhalb eines Repeats und auch zum nachfolgenden Repeat aus. Die Konsensusaminosäure ist L, wobei nur an Positionen 24 und 28 ein V bzw. ein A ist. L10 und L17, die beide auf derselben Seite der H2 im Armadillorepeat stehen, bilden intensive Kontakte zum Repeat N+1 (Reste 4, 5, 9, 12, 16), während V24 zur anderen Seite zeigt und so mit Rest 22 und 26 des Repeats N-1 assoziiert. Die anderen hydrophoben Reste interagieren innerhalb des eigenen Repeats miteinander und stabilisieren so die Faltung. Ein weiterer konservierter Rest in Armadillorepeats bildet P11. Prolin agiert häufig als ein Helixbrecher. Am N-Terminus der Helix H2 induziert es so den abrupten Knick zwischen H1 und H2. G8 erlaubt am C-Terminus der H1 ebenfalls einen scharfen Knick zwischen H1 und H2. Rest 34 ist häufig eine hydrophile Aminosäure, die auf der Oberfläche der H3 lösungsmittel exponiert ist. Dieser Rest ist häufig in Substraterkennung involviert, zum Beispiel spielt N34 in Importin α eine Rolle in der NLS-Erkennung.

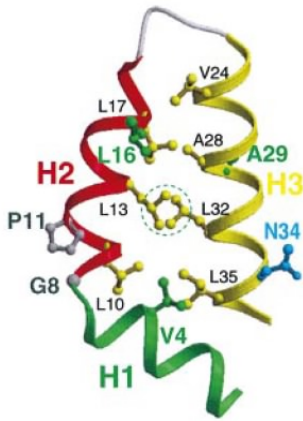


Abbildung 34: Repräsentativer Armadillorepeat aus Importin α . Die typischen Reste des hydrophoben Kerns sind farbig hervorgehoben (nach Andrade et al., 2001).

Die Armadillorepeatstruktur in FHOD1

Die FH3 Domäne in FHOD1 (Abb. 35) erstreckt sich von Aminosäure 115 bis 339 und ist aus fünf aufeinanderfolgenden Repeats aufgebaut, wobei der erste Repeat einen Heatrepeat darstellt, der aus zwei Helices HA und HB gebildet wird, und die übrigen vier Repeats Armadillopeats sind, die aus drei Helices H1, H2 und H3 bestehen. Dabei ist Helix H1 die kürzeste, wobei der Übergang zwischen H1 und H2 den charakteristischen Knick ausbildet, um die Form des Repeats aufrechtzuerhalten. Der fünfte Armadillorepeat ist leicht gedreht, die abweichende Lage der Helices ist vermutlich durch fehlende Interaktion zum nächsten Repeat induziert.

Die Konsensussequenz der Armadillopeats (Abb.35B) beruht auf der Sequenz des Importin α -Proteins (Conti et al., 1998). Aufgrund der geringen Konsensusanforderungen dieser Strukturen konnte die Zuordnung der einzelnen Repeats in FHOD1 erst mit den in dieser Arbeit gezeigten strukturellen Daten erfolgen. Vorhergehende Sekundärstrukturvorhersagen schlugen fehl, die genauen Grenzen der Armadillopeats vorherzusagen (Nezami et al., 2006).

Eine Besonderheit der Armadillo Repeats in FHOD1 sind die stark unterschiedlichen Längen der einzelnen Repeats. Sie variieren zwischen 36 und 55 Aminosäuren, was eine weitere Schwierigkeit darstellte, die Positionen der einzelnen Repeats ohne Strukturdaten zu bestimmen. In der Struktur fällt deshalb eine unregelmäßige Form der Repeats auf (Abb.35A).

Das Fragment, welches zur Strukturklärung geführt hat, umfasste die Aminosäuren 1-339. Somit ist die Struktur bis zur letzten Aminosäure des Konstrukts definiert. Unter den darauffolgenden 40 Aminosäuren (340-379) sind viele geladene Reste, Serine und Proline, die typischerweise in intrinsisch unstrukturierten Bereichen in Proteinen (Tompa, 2002) zu finden sind. Die Annahme eines unstrukturierten Bereichs ab Rest 340 stimmt mit der experimentellen Beobachtung überein, dass vier Proteinfragmente mit unterschiedlichen C-Termini (339, 357, 369 und 377) unter den gleichen Bedingungen kristallisierten.

Aus der Analyse der Sequenz des letzten Repeats der FH3 Domäne kann unterstützend die Aussage getroffen werden, dass das tatsächliche Ende der Armadillorepeat Domäne mit der Aminosäure 339 festgelegt ist. Die Aminosäurepositionen, die die Interrepeatstruktur bilden sollten, wie H313 in H2, R324, E331 und K335 in H3 sind geladene Reste. Zur Assoziation mit einem weiteren Repeat müssten sie hydrophober Natur sein, so dass eine mögliche Interaktion zum nächsten Repeat hier unterbrochen werden würde.

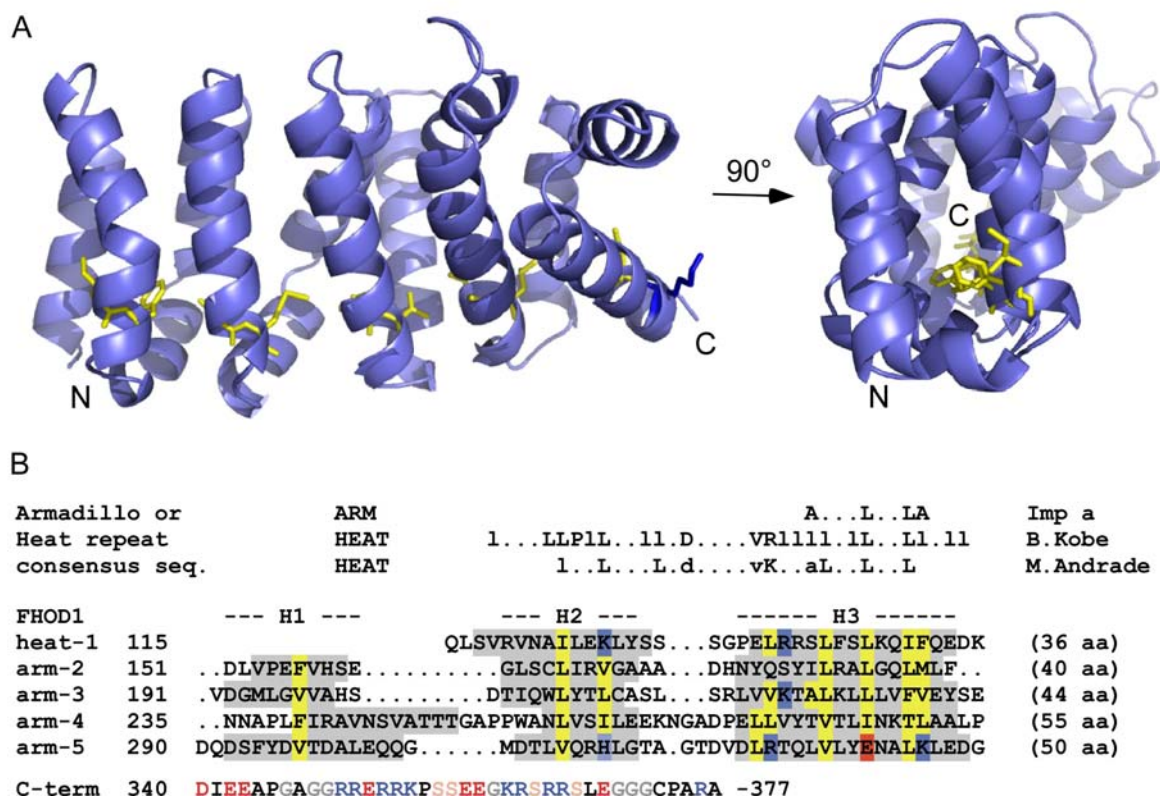


Abbildung 35: Struktur der Armadillorepeat FH3 Domäne (116-339). (A) Die FH3 Domäne in FHOD1 erstreckt sich von Aminosäure 115 bis 339 und ist aus fünf Armadillorepeats aufgebaut, wobei der erste Repeat einen Heatrepeat darstellt, und die übrigen vier Repeats Armadillorepeats sind. In A und B sind die hydrophoben Reste, die die Faltung im Kern stabilisieren und die Interrepeatstruktur bilden, in gelb hervorgehoben. (B) Strukturbasiertes Sequenzalignment der Armadillorepeatstruktur der FH3 Domäne. Die Konsensussequenzen für Heat- und Armadillorepeats sind oberhalb des Alignments dargestellt. Eine Besonderheit der Armadillorepeats in FHOD1 sind die stark unterschiedlichen Längen der einzelnen Repeats. Unter den 40 Aminosäuren, die sich an Aminosäure 339 anschließen (unterhalb des Alignments dargestellt), sind viele geladene Aminosäuren, sowie Proline und Serine, die unstrukturiert erscheinen.

Das Topologiediagramm des N-Terminus in FHOD1

Das Topologiediagramm (Abb. 36A) zeigt schematisch die Zuordnung der Helices zu den fünf Repeats in der FH3 Domäne. Im Vergleich dazu tauchen im Topologiediagramm der mDia FH3 Struktur (69-451; Rose et al., 2005) nur vier Repeats auf, stattdessen C-terminal eine „Interdomain“ Helix und anschließende Dimerisierungsdomäne. Obwohl die beiden Topologiediagramme eine unterschiedliche Anordnung erkennen lassen, wurde eine Superimposition der beiden Strukturen durchgeführt (Abb. 36B).

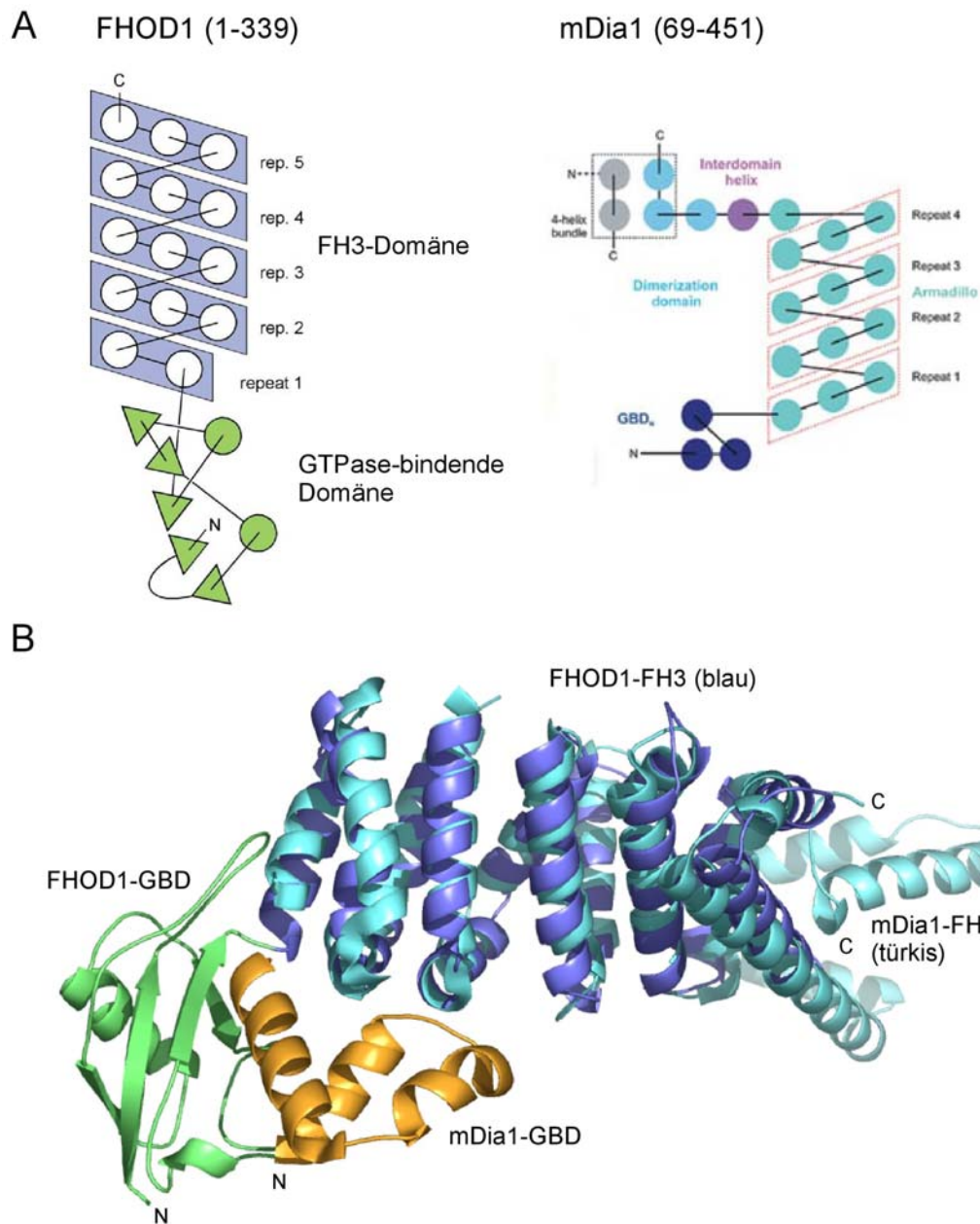


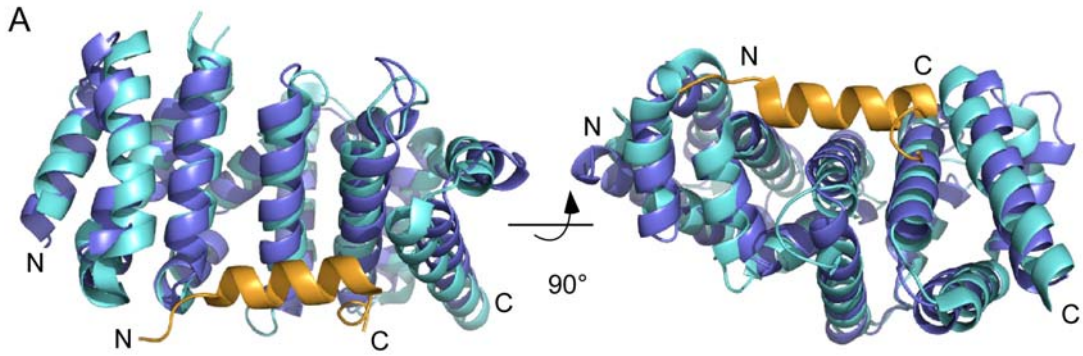
Abbildung 36: Struktureller Vergleich der N-terminalen Regionen aus FHOD1 und mDia1. (A) Topologiediagramme von FHOD1 und mDia1 (aus Rose et al., 2005). Das Topologiediagramm von FHOD1 zeigt eine N-terminale RBD und anschließend fünf helikale Repeats. Im Vergleich dazu zeigt das Topologiediagramm für den homologen Bereich in mDia1 nur vier Repeats und stattdessen C-terminal eine „Interdomain“-Helix und anschließende Dimerisierungsdomäne. Der N-terminale Bereich ist im Gegensatz zu FHOD1 auch α -helikal. **(B)** Superimposition der FH3 Domänenstruktur von mDia1 und FHOD1. Für die $C\alpha$ Atome der ersten vier inneren Helices beträgt der RMSD Wert 1.38 Å, berechnet mit LSQMAN (Kleywegt and Jones, 1994). Die Armadillopeaks weisen zwar Unterschiede in den Repeatlängen auf, überlagern dafür aber deutlich mit allen fünf H3 Helices der Repeats. Die mDia1 Struktur besitzt ebenso fünf Repeatelemente. Die N-terminale Region zeigt hingegen unterschiedliche Strukturmerkmale und eine andere Orientierung zur FH3 Domäne.

Superimposition von FHOD1 (1-339) mit mDia1 (69-451)

Bei der Strukturüberlagerung fällt auf, dass die Armadillopepeats zwar Unterschiede in den Längen der einzelnen Helices aufweisen, dafür aber deutlich in allen fünf H3's übereinstimmen. Für die C α Atome der ersten vier inneren Helices beträgt der RMSD Wert 1.38 Å (LSQMAN, Kleywegt and Jones, 1994). Die mDia Struktur besitzt wie FHOD1 fünf Repeats. Die Abweichungen zum Topologiediagramm ergeben sich aus der Zählweise des ersten Repeats, der offensichtlich auch bei mDia aus zwei Helices aufgebaut ist. Somit stellen die beiden FH3 Domänen eine ähnliche Anordnung ihrer fünf Repeats dar, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Länge und Aminosäurezusammensetzung in den Repeats stark voneinander (siehe Abb. 37B). Weiter unterscheiden sich die Strukturen im anschließenden C-Terminus voneinander. Die Region in FHOD1 ist ab Aminosäure 339 vermutlich unstrukturiert. Die N-terminale Region zeigt ebenfalls eine unterschiedliche Faltung und Orientierung zur FH3 Domäne. Auf diese RBD wird später detailliert eingegangen.

FH3-DAD Interaktion

Da die Überlagerung der mDia- und FHOD1-FH3 Domänen eine gute Übereinstimmung lieferte und eine ähnliche Anordnung der Repeats erkennen ließ, wurde anschließend das DAD Peptid basierend auf der FH3/DAD Komplexstruktur aus mDia (Lammers et al., 2005) in die FHOD1 Struktur modelliert (Abb. 37A). Das DAD Peptid ist ein konservierter Bereich des C-Terminus, der in Diaphanous verwandten Forminen mit der FH3 Struktur assoziiert. Das Peptid beinhaltet das konservierte hydrophobe Bindungsmotiv MDxLL und ein anschließendes positiv geladenes Cluster. Die Sequenz der FHOD1-DAD ist im Alignment zur mDia-DAD in Abb. 37D dargestellt. Beide Sequenzen besitzen diese konservierten Merkmale. In der mDia Komplexstruktur sind nur 16 (1180-1195) der 56 Reste der DAD sichtbar, welche das konservierte MDxLL Motiv, nicht aber die positiven Reste, enthalten. Die ersten zwölf Aminosäuren der DAD bilden in der mDia FH3/DAD Komplexstruktur eine amphiphatische Helix, die hauptsächlich mit hydrophoben Resten in der FH3 Domäne von mDia interagieren (A256, I259 und L260 in mDia1) und die Bindung zusätzlich über Salzbrücken (N217 und K213 in mDia1) stabilisieren. Im Vergleich zu FHOD1 fällt auf, dass an den entsprechenden Positionen in FHOD1 keine hydrophoben Aminosäuren vorliegen (Aminosäure A256 in mDia1 entspricht V228 in FHOD1, desweiteren entsprechen I259 und L260 den Resten E231, Y232 in FHOD1 (rot gekennzeichnet in Abb. 37B) und somit auch keine detaillierten Rückschlüsse auf ein ähnliches Bindungsmuster der DAD in FHOD1 gezogen werden können. Die positiv geladenen Reste K213 und N217 in mDia1, die elektrostatische Wechselwirkungen mit D1183 in der DAD eingehen, sind an entsprechenden Stellen in FHOD1 G285 und L289. Die fehlenden geladenen Reste könnten durch R283 kompensiert werden, das dann nach Konformationsänderung mit D1009 interagieren müsste. Auffällig ist, dass dieses Arginin ebenfalls in mDia1 existiert (R210), aber nicht mit der DAD wechselwirkt.

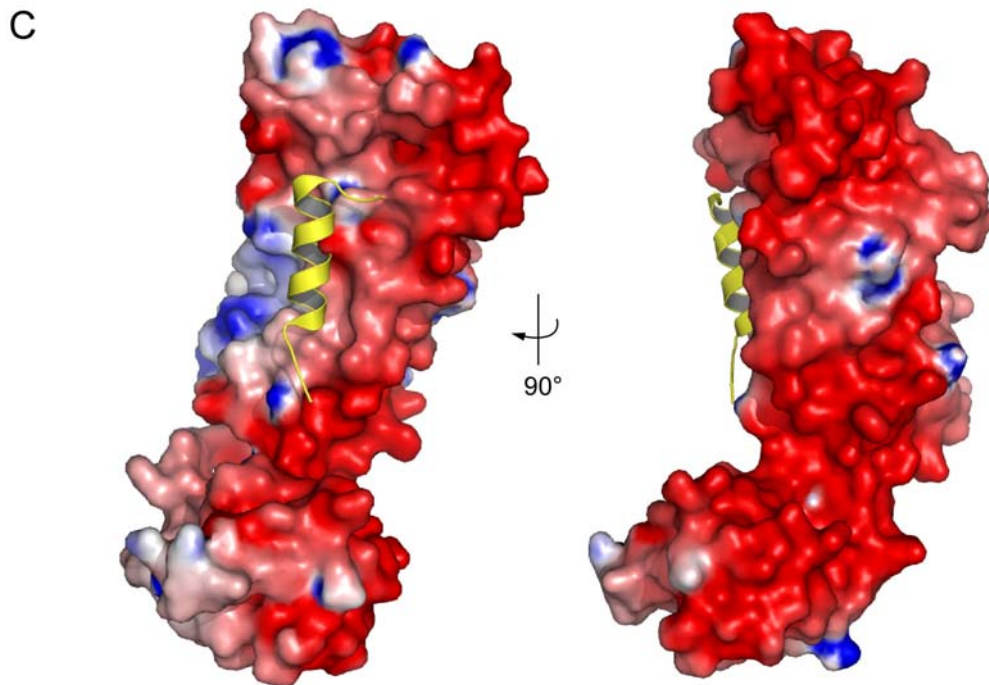


B

mDial	---	H1	---	---	H2	---	-----	H3	-----
heat1	135				SAMMYIQELRS...		GLRDMHLLSCLES	LRVSLNNN...	
arm-2	167	..PVS	WQTF...		GAEGLASLLDILKRLHDEK (6)		YDSRNQHEIIRCLKAFMN...		
arm-3	218	..NKFGIK	TMLET.....		EEGILLVLRAMDPA..		VPNMMIDAAKLLSALCII	POP...	
arm-4	264	EDMNERVLEAM	TERAEMDEVERFQPLLDGLKSGT...		SIALKVGCLQLINALITPA.....				
arm-5	317	EELDFRVHIR	SELMRL.....		GLHQVLQELREIE...		NEDMKVQLCVFDEQGD	EDFFDLKGRLLDDIRMEMDD	

FHOD1	---	H1	---	---	H2	---	-----	H3	-----
heat1	115				QLSVRVNAILEKLYSS...		SGPELRRSLFSLKQIFQEDK		
arm-2	151	..DLVPEFVHSE		GLSCLIRVGAAA...		DHNYQSYILRALGQLMLF..		
arm-3	191	..VDGMLGVVAHS		DTIQWLYTLCASL...		SRLVVKTALKLLLVFVEYSE		
arm-4	235	..NNAPLFI	RAVNSVATTTGAPPWANLVSI		LEEKNG..		ADPELLVYTVTLINKTLAALP		
arm-5	290	DQDSFYDVTDALE	QQG.....		MDTLVQRHLGTA..		GTDVDLRTQLVLYENALKLEDG		

C-term 340 D I E E A P G A G G R R E R R K P S S E E G K R S R R S L E G G G C P A R A -377



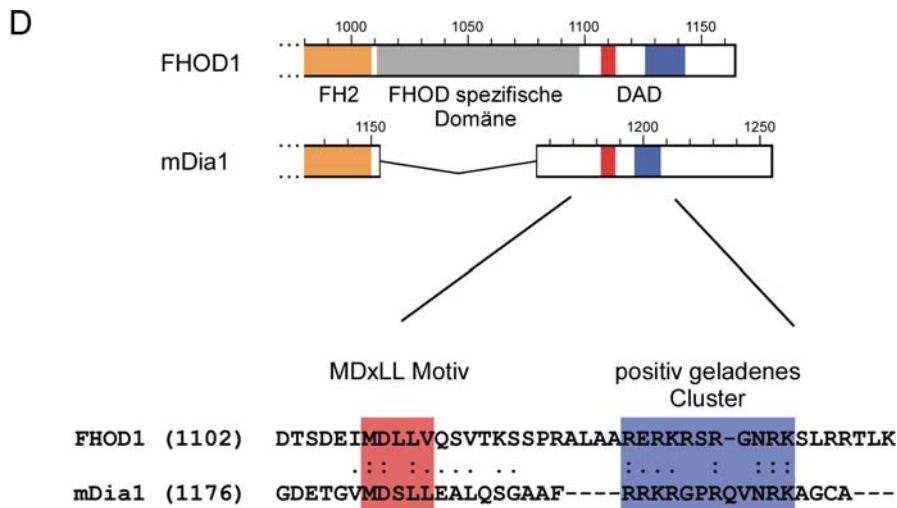


Abbildung 37: Vergleich der FH3-DAD Komplexbildung in FHOD1 und mDia1. (A) Modell des FH3-DAD Autoregulationskomplexes basierend auf der Struktur von mDia1. In der mDia1-Komplexstruktur sind 16 (1180-1195) Reste der DAD sichtbar (Lammers et al., 2005). (B) Strukturbasiertes Sequenzalignment der FH3 Domäne aus FHOD1 und mDia1. Die vier zugeordneten Aminosäuren, die in mDia an der Interaktion zur DAD beteiligt sind, wurden rot unterlegt. Die entsprechenden Reste in FHOD1 sind ebenfalls hellrot eingefärbt. Auffallend ist, dass an den entsprechenden Positionen in FHOD1, die in der mDia-FH3/DAD-Komplexstruktur die Interaktion diktiert, keine hydrophoben Aminosäuren vorliegen. (C) Darstellung des elektrostatischen Potentials ($-8 k_B T$ bis $+8 k_B T$) auf der FHOD1 Oberfläche (kalkuliert mit GRASP, Nicholls, Sharp and Honig, 1991) mit dem modellierten DAD Peptid, wobei die rechte Darstellung um 90° relativ zu der linken Abbildung gedreht ist. Negative Potentiale sind rot, positive blau dargestellt. (D) Vergleich der DAD in mDia1 und FHOD1. Schematischer Vergleich und Sequenzalignment der beiden Regionen aus FHOD1 und mDia. Die konservierten, Autoinhibition induzierenden Elemente MDxLL (rot) und das positive Ladungscluster (blau) sind in beiden Forminen zu finden. Bemerkenswert ist die in Forminen einzigartige Unterdomäne in FHOD1 (grau), dessen Funktion noch unbekannt ist.

In der Darstellung der elektrostatischen Oberfläche des FHOD1 Moleküls ist eine Region erkennbar, die nur schwach geladen zu sein scheint (Abb. 37C). Lösungsmittlexponierte hydrophobe Reste bilden eine Vertiefung, in welche die helikale DAD modelliert werden kann. Die negativ geladene Asparaginsäure aus dem konservierten MDxLL-Motiv müsste mit basischen Aminosäuren interagieren, die durch Sequenzvergleiche nicht zu identifizieren sind. C-terminal schliesst sich an das MDxLL-Motiv ein negativ geladener Bereich an, der zur Interaktion mit der C-terminalen basischen Region in der DAD (1126-1136) dienen könnte. Das FHOD1-DAD Peptid hat zwischen dem MDxLL-Motiv und der basischen Region einen vier Aminosäuren langen Einschub, so dass das hier gezeigte Peptid einen weiteren Turn aufweisen könnte. Die für FHOD Proteine einzigartige Region zwischen der FH2 Domäne und der DAD könnte ebenfalls in die Autoregulation involviert sein. Weitere funktionelle Daten biochemischer als auch kristallographischer Natur sind hier notwendig, um die hier vorgeschlagene DAD/FH3 Interaktion in FHOD1 zu untermauern.

Parallel zu der Strukturbestimmung der singulären Proteindomänen wurden zur Analyse des Autoinhibierungsmechanismus Kristallisationsassays mit einem 30 bzw. 14 Aminosäuren langen DAD Peptid (1104-1133 bzw. 1104-1117) und dem FHOD1-U1 Fragment (1-339) durchgeführt. Es wurde ein 1:1 Komplex kokristallisiert (Abb. 32). Die mit diesen Kristallen erzielte Auflösung war allerdings auf 7 \AA beschränkt.

4.11.2 Struktur der N-terminalen Domäne (1-115)

In initialen Analysen der Domänenarchitektur mit den Programmen SMART („simple modular architecture research tool“) und Pfam („Protein families database“) konnte dem N-terminalen Bereich von FHOD1 keine bekannte Domänenfamilie zugeordnet werden. Da Sekundärstrukturvorhersagen α -helikale Elemente in den ersten 100 Aminosäuren vermuteten, war unter anderem anzunehmen, dass die Armadillorepeatstruktur sich eventuell N-terminal weiter fortsetze. Dem einzigen anderen bisher N-terminal strukturell charakterisierten Formin mDia1 fehlen die ersten 70 N-terminalen Aminosäuren (Rose et al., 2005; Nezami et al., 2006). Überraschenderweise wurde in der FHOD1-Struktur deutlich, dass die N-terminalen 115 Reste eine Ras-bindende Domäne (RBD) bilden. RBDs haben eine Ubiquitin Faltung und können an GTPasen der Ras Familie binden. Unter den bekannten RBDs wurde für einige gezeigt, dass sie als Ras Effektoren nur aktiviertes GTP-gebundenes Ras binden. Trotz schwacher Sequenzhomologie nehmen die RBDs eine gemeinsame Faltung, den Ubiquitinsuperfold, an (Kiel et al., 2005; Wohlgemuth et al., 2005). Die Ubiquitin Faltungstopologie gehört zu einer der neun am häufigsten vorkommenden Superfolds, welche die „ubiquitin alpha beta roll“ ($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) bilden. Die Ubiquitin Superfamilie basiert auf nur schwacher Sequenzhomologie, aufgrunddessen diese Domänenfaltung in Strukturvorhersagen schwer zu erkennen ist und zum Beispiel in FHOD1 nicht gefunden wurde.

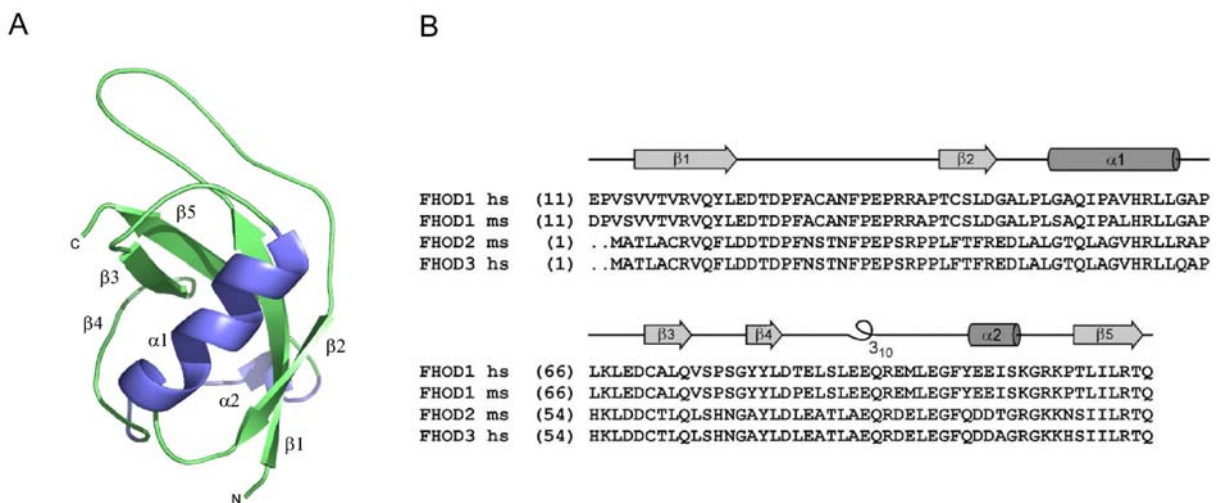


Abbildung 38: Der N-Terminus in FHOD1 (1-115) bildet eine RBD. (A) FHOD1 bildet ein fünfsträngiges, antiparalleles β -Faltblatt, unterbrochen von zwei charakteristischen α -Helices, die zusammen den Ubiquitinsuperfold bilden. Die α -Helices und β -Faltblätter sind vom N- zum C-Terminus hin nummeriert. **(B)** Vergleich eukaryotischer FHOD Sequenzen mit den in dieser Arbeit bestimmten Sekundärstrukturelementen des N-Terminus in humanem FHOD1. Der N-Terminus ist in den bisher bekannten FHOD-Proteinen konserviert und es kann vermutet werden, dass die hier gezeigten eukaryotischen FHOD-Proteine im Gegensatz zu anderen Forminen ebenfalls eine Ubiquitin faltung ausbilden. Die Zahlen entsprechen der jeweiligen ersten Aminosäure in der dargestellten Sequenz.

Der Ubiquitinsuperfold in FHOD1

Die Struktur der RBD in FHOD1 ist in Abb. 38 gezeigt. Werden verschiedene eukaryotische FHOD-Sequenzen mit der Sequenz und den in dieser Arbeit bestimmten Sekundärstrukturelementen in humanem FHOD1 verglichen, fällt eine hohe Konservierung dieser Region auf (Abb.38B). Es kann daher vermutet werden, dass die vier bisher charakterisierten eukaryotischen FHOD-Proteine im Gegensatz zu anderen Forminen N-terminal eine Ubiquitinfaltung ausbilden.

Die stabile Faltung in Proteinen der Ubiquitin-Superfamilie wird durch einen konservierten, hydrophoben Kern erzeugt (Abb. 39A). In der Sekundärstrukturdarstellung (Abb. 39C) sind die in FHOD1 beteiligten Reste farblich hervorgehoben. Sie bilden vier Lagen innerhalb des Proteins, die den hydrophoben Kern der Tertiärstruktur bilden. Der endständige $\beta 4$ -Strang des Faltblatts ist gegenüber dem zentralen $\beta 1$ -Strang annähernd um 90° gedreht, was durch die verbindende Helix $\alpha 1$ bewirkt wird und unter anderem dazu führt, dass die Reste einer hydrophobe Ebene in $\beta 3$ und $\beta 4$ relativ zu $\beta 2$, $\beta 1$ und $\beta 5$ sich um zwei Aminosäuren verschieben. In Abbildung 39B ist die strukturelle Topologie der einzelnen β -Faltblätter ($\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 5$ - $\beta 3$ - $\beta 4$) schematisch dargestellt.

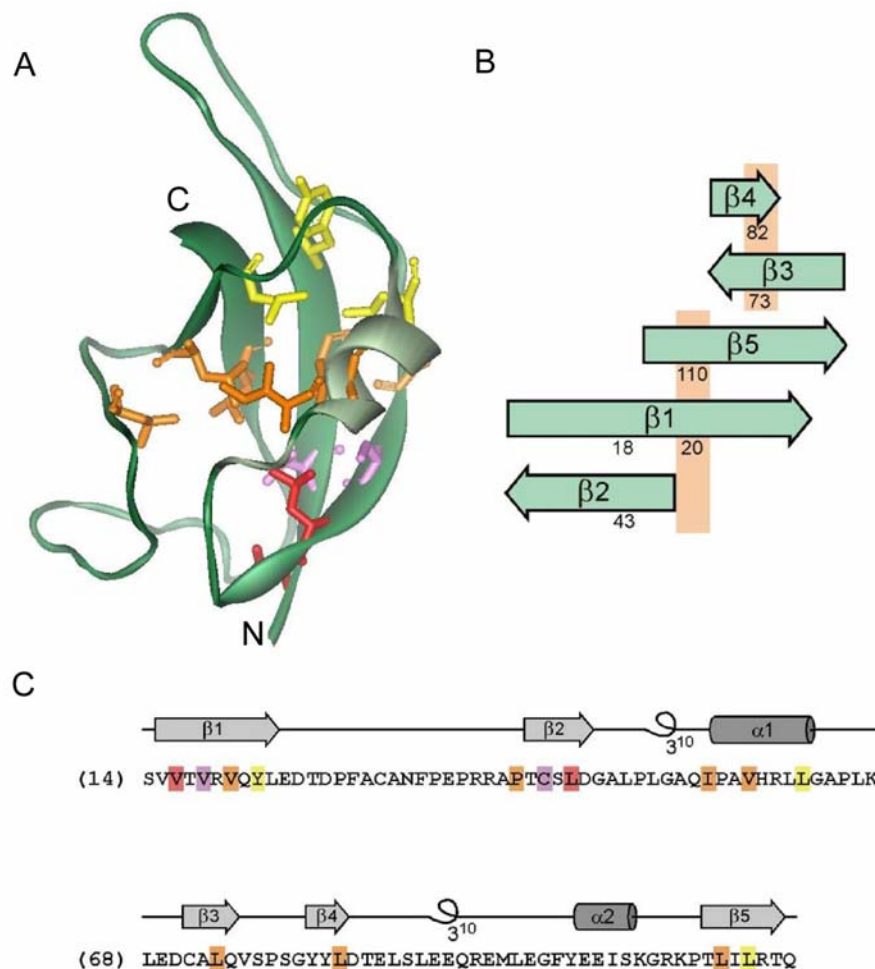


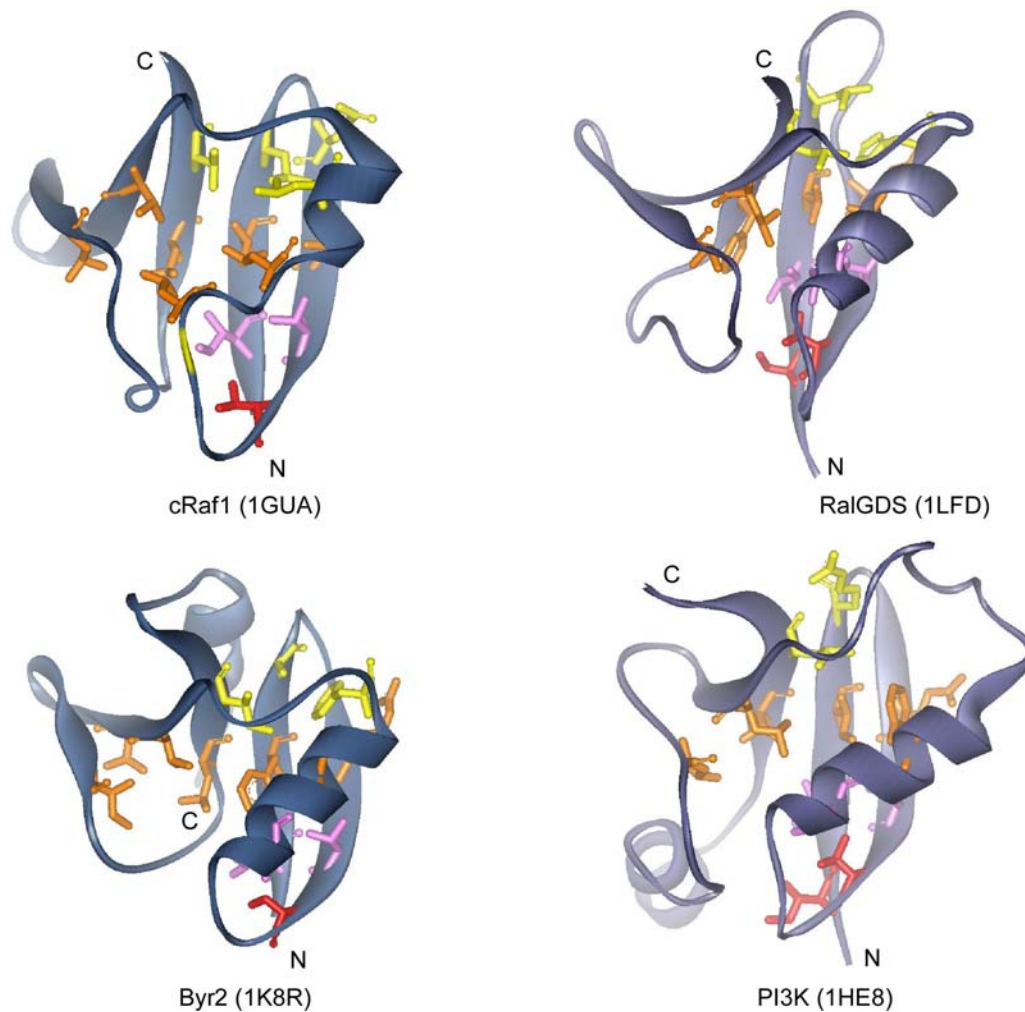
Abbildung 39: Die RBD Faltung wird in FHOD1 durch einen hydrophoben Kern gebildet. (A) Die beteiligten Resten bilden vier hydrophobe Lagen innerhalb des Proteins und sind hier mit vier verschiedenen Farben (rot, magenta, orange, gelb) dargestellt. (B) Schematische Darstellung der einzelnen β -Falblattstränge (im β -Falblatt) relativ zueinander ($\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 5$ - $\beta 3$ - $\beta 4$). (C) Darstellung der in dieser Arbeit bestimmten Sekundärstrukturelemente und der zugehörigen FHOD1-Sequenz.

Das SMART Programm klassifiziert fünf Familien der Ubiquitin Topologie, die als „ubiquitin domain subfamilies“ bezeichnet werden: (a) Ubiquitin-Homologe, (b) Ras-Assoziations Domäne (RA), (c) Ras-bindende Domäne (RBD), (d) RBDs der Phosphatidylinositol-(3)-Kinase (PI3K) Familie und (e) B41/ERM Domäne Familie. Die RA, RBD und PI3K_RBD Domänen sind dafür bekannt, mit Ras-Proteinen im GTP gebundenen Zustand zu interagieren. Diese Domänen sind in den intensiv charakterisierten Effektorproteinen Raf Kinase, RalGDS, Byr2 und PI3K enthalten. Die B41 Domäne ist in Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Familie Proteinen enthalten, die eng mit dem Zytoskelett verknüpft sind und eine Verbindung zwischen F-Aktin und Membran-assoziierten Proteinen darstellen (Kiel and Serrano, 2006). Domänen mit Ubiquitin Faltung sind – mit Ausnahme von Ubiquitin selbst – in vielen Multidomänenproteinen präsent und in verschiedenen Signaltransduktionsprozessen involviert.

In den vergangenen zehn Jahren ist die Analyse der mit GTPasen interagierenden Effektoren und der Spezifität der Bindung durch Bestimmung einzelner Komplexstrukturen weit vorangeschritten. Exemplarisch sind hier die Strukturen der RBDs von c-Raf1 (Nassar et al., 1995) (PDB code 1GUA), RalGDS (Huang et al., 1998) (1LFD), Byr2 (Scheffzek et al., 2001) (1K8R) und PI(3)-K (Pacold et al., 2000) (1HE8) in Abb. 40A dargestellt (aus Ras-Komplexstrukturen), die alle Homologien zu der RBD aus FHOD1 zeigen. Die Abbildungen entstammen jeweils den Kristallstrukturen eines Ras/Effektor Komplexes. Die zuerst bestimmte Komplexstruktur war die des Ras Effektors c-Raf1 im Komplex mit Rap, der als Ser/Thr Kinase eine Kaskade von Proteinkinasen initiiert (Nassar et al., 1995).

Nach Zuordnung der hydrophoben Reste, welche die Faltung stabilisieren, konnte ein strukturbasiertes Sequenzalignment mit FHOD1, den dargestellten RBDs und Ubiquitin aufgestellt werden (Abb. 40B). Dabei ist zu bemerken, dass nicht die Aminosäure selbst konserviert ist, sondern nur ihre hydrophobe Eigenschaft innerhalb der Kernstruktur der Ubiquitin-Superfaltung. Auffallend in FHOD1 sind eine 16 Aminosäuren langer Schleife zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ und eine ungewöhnlich lange Helix $\alpha 2$. Durch diese Besonderheiten wird verständlich, dass Sekundärstrukturvorhersagen die Ubiquitinfaltung in FHOD1 nicht erkannt haben.

A



B

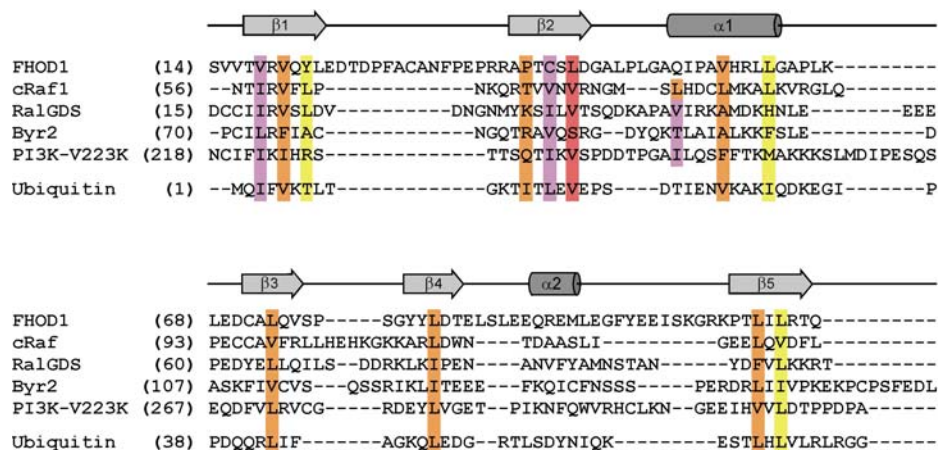
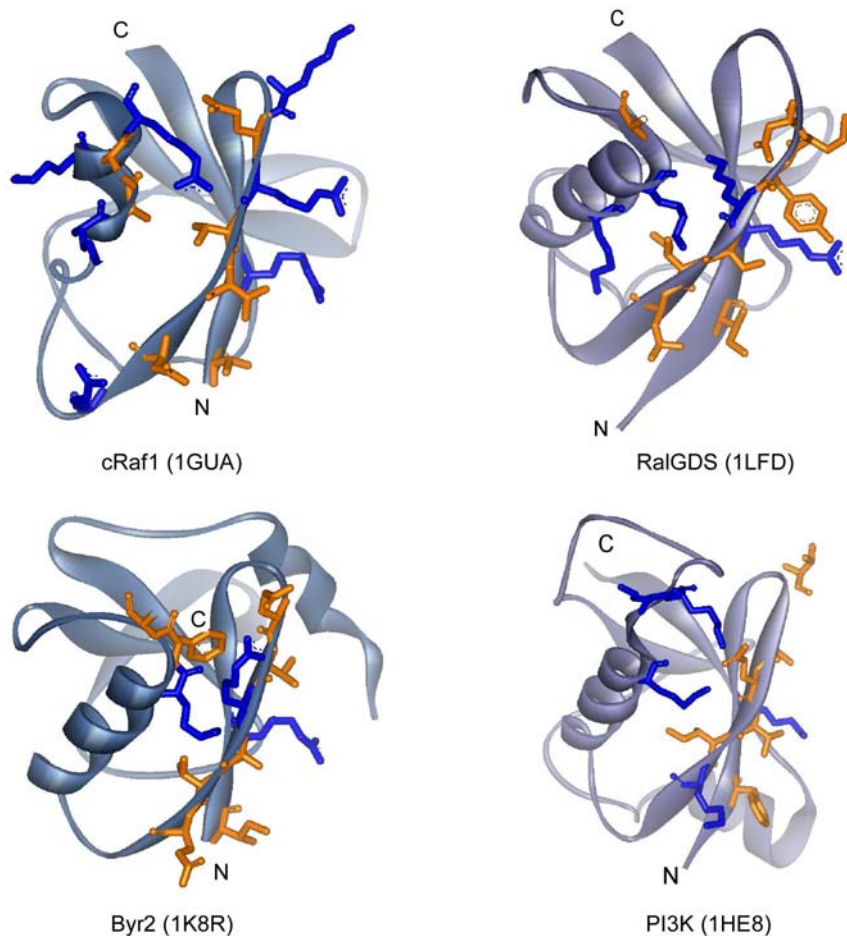


Abbildung 40: Die RBDs von c-Raf1, RalGDS, Byr2 und PI(3)-K zeigen Homologien zu der RBD aus FHOD1. (A) Alle Strukturen bilden eine Ubiquitin-faltung mit dem charakteristischen hydrophoben Kern. Die Farbkodierung ist der in Abb. 39 angepasst und die Koordinaten entstammen Komplexstrukturen. (B) Vergleich verschiedener RBD Sequenzen. Auffallend in FHOD1 sind eine 16 Aminosäuren lange Schleife zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ und eine ungewöhnlich lange $\alpha 2$ -Helix.

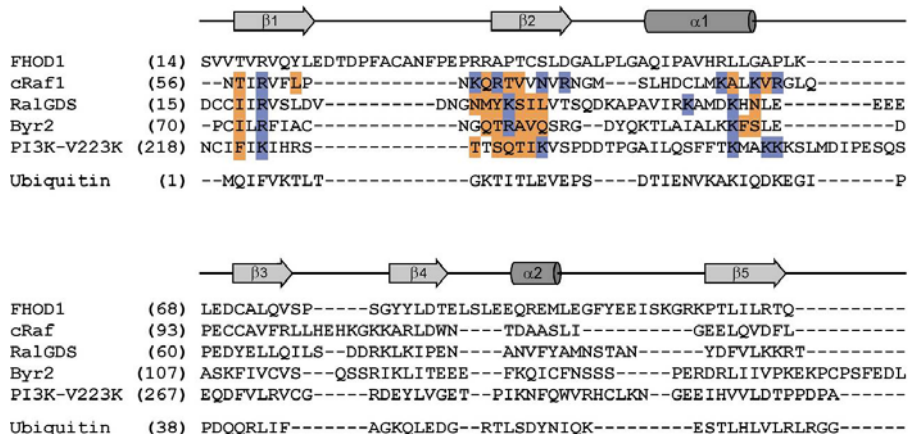
Klassifizierung der FHOD-Ubiquitininfaltung als RBD

Die N-terminalen Domäne aus FHOD1 konnte als Protein mit einer Ubiquitininfaltung identifiziert werden. Die Proteine mit einem Ubiquitinsuperfold werden wie zuvor erwähnt wiederum in fünf Familien eingeteilt, die unterschiedliche, zelluläre Funktionen ausüben. Somit bestimmt nicht allein die Tertiärstruktur, ob ein Protein mit Ubiquitininfaltung als Ras-bindende Domäne klassifiziert werden kann. Den hydrophoben Resten, die die Kernstruktur ausbilden, kann keine funktionale Bedeutung zugeschrieben werden. Somit müssen andere Reste die Assoziation mit der GTPase ausführen. Konservierte Reste auf der Oberfläche des Proteins determinieren ein Protein mit Ubiquitininfaltung als RBD.

A



B



C

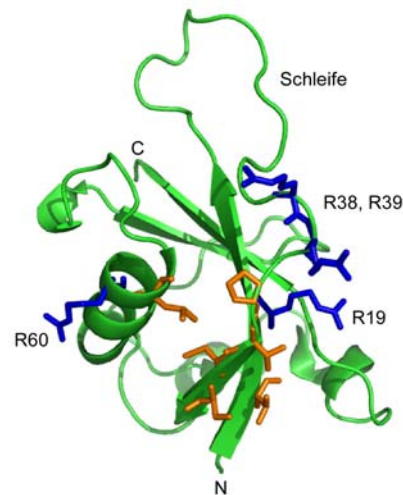


Abbildung 41: Vergleich der Ras Interaktion verschiedener Ras-bindender Domänen. (A) Darstellung der Reste auf der RBD, die an der Interaktion mit der GTPase beteiligt sind. Die gezeigten Strukturen entstammen Komplexstrukturen, in denen die hier gezeigten Ladungen an der Ras Bindung beteiligt sind. Die positiv geladenen Aminosäuren sind blau und die anderen an der Bindung beteiligten Reste orange dargestellt. **(B)** Vergleich der Aminosäuren, die an der Bindung zu der GTPase beteiligt sind. In diesem Sequenzalignment werden die positiven Ladungen der in A dargestellten RBD's hervorgehoben. FHOD1-RBD besitzt an kritischen Positionen ebenfalls positive Ladungen: R19, 38, 39 und 60. Die Zahlen entsprechen der jeweiligen ersten Aminosäure in der dargestellten Sequenz. **(C)** Darstellung der positiv geladenen Reste (blau) und auf der Oberfläche von FHOD1, die in Analogie zu c-Raf1 an der Interaktion mit einer GTPase involviert sein könnten (blau und orange).

Als Effektorproteine binden RBD's Ras GTPasen. Mitglieder der Ras Familie haben eine wichtige Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen, indem sie Zellwachstum und Differenzierung regulieren. Ras Effektoren haben ganz unterschiedliche Funktionen, einige haben katalytische Aktivität (Raf, PI3K) und andere agieren als Adapterprotein (AF6). Die Art der Interaktion ist für alle RBD's ähnlich, der Effektor und das Ras Protein bilden ein intermolekulares β -Faltblatt mit dem endständigen β 2-Strang der RBD und dem β 2-Strang der GTPase aus (Herrmann, 2003; Wittinghofer and Nassar, 1996). Zusätzlich ist β 1 und α 1 der RBD an der Bindung beteiligt. Die Assoziation findet hauptsächlich über geladene Aminosäureseitenketten statt. Die Spezifität für entweder Ras oder Rap Bindung wird hier von einigen Schlüsselresten auf der Bindungsoberfläche diktiert. Positiv geladene Reste aus den Sekundärstrukturelementen der Ubiquitinfaltung β 1, β 2 und α 1 bilden auf der Oberfläche der Tertiärstruktur die „hot spots“ der Bindungsoberfläche. Diese Reste sind notwendig, um eine RB-Domäne als tatsächlichen Kandidaten eines Ras-Effektors zu qualifizieren. Die Oberflächen der Bindungspartner werden hauptsächlich durch entgegengesetzte Ladungen determiniert, wobei die Ras Oberfläche negativ und die der RBD überwiegend positiv geladen ist. Für die Assoziation und die Spezifität ist das Ladungsmuster innerhalb der Effektor-domäne von entscheidender Bedeutung. Die bisher bekannten Komplexstrukturen (Rap/Raf, Ras/RalGDS, Ras/Byr2 und Ras/PI3K) bilden alle ein intermolekulares β -Faltblatt aus. Exemplarisch sind in Abb. 41A die positiv geladenen Aminosäuren der RBDs von c-Raf1, RalGDS, Byr2 und PI(3)-K, die in Ras Bindung involviert sind, dargestellt. Die hier gezeigten Strukturen stammen alle aus Komplexstrukturen. Es scheint, als diktiert die Anzahl der positiven Ladungen die Stärke der

Bindung, da beispielsweise der hier stärkste Binder (cRaf1/H-Ras $K_d = 80$ nM; Wohlgemuth et al., 2005) die größte Anzahl an positiven Ladungen aufweist.

In der Struktur (Abb. 41C) der FHOD1 RBD existiert ein positives Ladungsmuster auf der Oberfläche, das möglicherweise in GTPasen Bindung involviert sein könnte. Hervorzuheben sind hier die Reste R19, R38, R39 und R60, wobei jedoch auffällt, dass sie für eine Interaktion über ein intermolekulares Faltblatt konformationelle Änderungen eingehen müssten. So müssten R60 auf $\alpha 2$ und R38 und R39 am Ende der Schleife durch Konformationsänderungen in die Nähe der GTPase gelangen. Zusammenfassend sind die positiven Ladungen in einem strukturbasierten Sequenzalignment dargestellt (Abb. 41B). Hier wird ersichtlich, dass die exakten Positionen, Art der Aminosäure und Anzahl der positiven Reste variieren können und für jeden Effektor ein spezifisches Ladungsmuster besteht. Die wichtigen Interaktionen mit Ras finden über die Strukturmerkmale $\beta 1$, $\beta 2$ und $\alpha 1$ statt. Die Überlagerung mit der RBD der Kinase PI3K ist in Abb. 42 dargestellt. Die Super-imposition wurde mit dem Programm COOT (Krissinel and Henrick, 2004) erstellt und ein RMSD Wert für die C_α -Atome der Hauptkette von 2.5 Å berechnet.

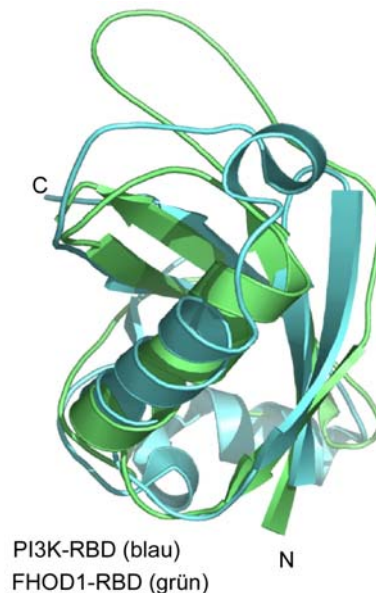


Abbildung 42: Superimposition der RBD aus FHOD1 mit der RBD aus PI3K. Die Superimposition wurde mit dem Programm COOT (Krissinel and Henrick, 2004) erstellt und ein RMSD Wert für die C_α -Atome von 2.5 Å berechnet.

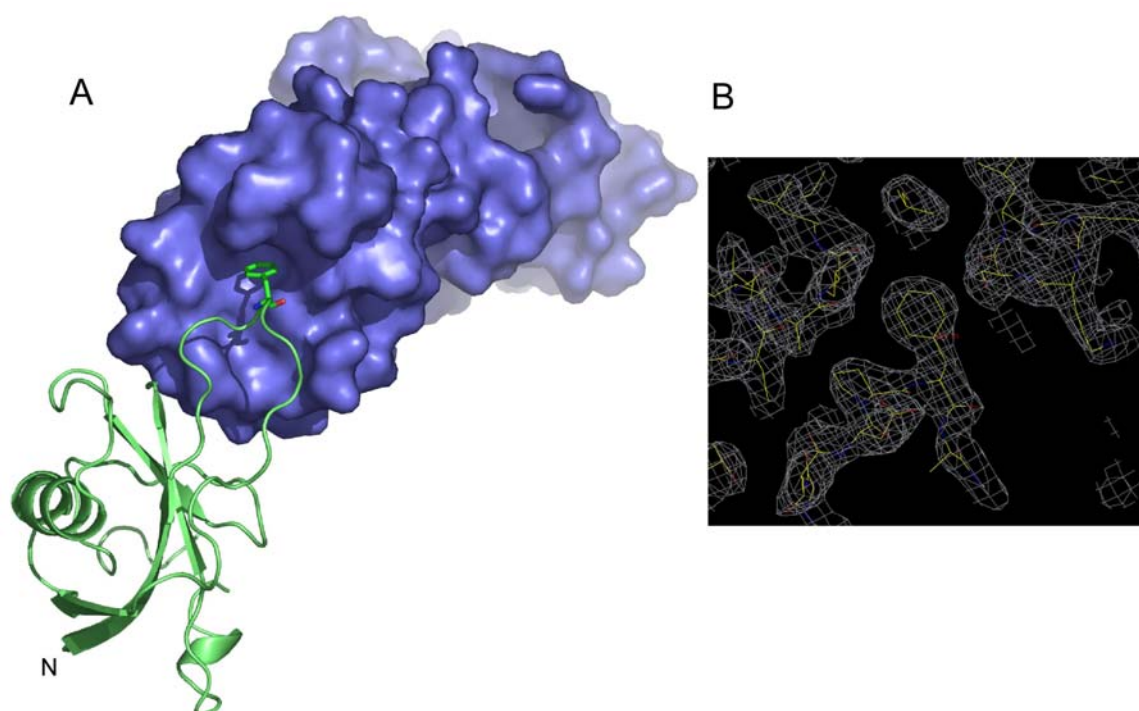


Abbildung 43: Mögliche Interaktion der FHOD1-RBD mit einer GTPase. (A) Darstellung der RBD-FH3 Bindungsoberfläche. Die FH3 Domäne bildet mit dem ersten Heatrepeat eine hydrophobe Tasche, in die der lange Loop der RBD hineinragt. Die FH3 Domäne ist als Oberfläche dargestellt und in der RBD das F29 als Stickpräsentation hervorgehoben, da dieser Rest zentral in der Tasche zu liegen kommt. (B) Darstellung der 2IFol - IFcl Composite-Omit Mappe aus dem Programm O (Jones and Kjeldgaard, 1991). Im Mittelpunkt ist das F29 dargestellt.

Die schon erwähnte strukturelle Besonderheit der FHOD1 RBD, nämlich die Schleife zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$, könnte Auswirkungen auf die mögliche GTPasen Interaktion haben. Zur möglichen Assoziation der FHOD1-RBD mit einer GTPase müssten Konformationsänderungen dieser Schleife eintreten. Die Darstellung der RBD-FH3 Bindungsoberfläche lässt allerdings erkennen, dass der Loop (24-39) zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ sich in der Struktur an den ersten Heatrepeat (115-150) anlagert. F29, das zentral im Loop liegt, bindet in eine hydrophobe Tasche der FH3 (Abb. 43). Durch diese starke Interaktion ist der Loop fixiert und möglicherweise fehlt der RBD die notwendige Flexibilität für Bindung an eine GTPase. Zusätzlich könnte das Fehlen eines Linkers zwischen den beiden Domänen Assoziation mit einer GTPase verhindern, weil die beiden Domänen relativ starr zueinander stehen und wenig Konformationsänderungen ermöglichen. Inzwischen durchgeführte Expressionsstudien der singulären FH3 Domäne (116-339) und eines Konstrukts FHOD1 (1-339) mit der Mutation F29G haben überraschenderweise gezeigt, dass diese beiden Fragmente nicht als lösliche Proteine gereingt werden können. Diese Beobachtung untermauert die Wichtigkeit der N-terminalen langen Schleife innerhalb der RBD für diese Struktur und die enge strukturelle Assoziation dieser beiden Domänen.

5 Diskussion

5.1 Regulation und virale Aktivierung des P-TEFb Komplexes

Charakterisierung der Cyclin T1/Hexim1-TBD Interaktion

In dieser Arbeit wurde die für die Interaktion mit Cyclin T1 notwendig Region in Hexim1 identifiziert und als stabile C-terminale Domäne mit den Grenzen (255-359) bestimmt. Ein N-terminal um zehn Aminosäuren verkürztes Konstrukt wies eine deutlich schwächere Bindung zu CycT1 auf, was darauf hinweist, dass diese Reste für die Interaktion sowie die Stabilität und Struktur des Proteins wichtig sind. Der N-terminale Bereich des Hexim1 Proteins scheint anhand seines Laufverhaltens im Gel unstrukturiert vorzuliegen. Der C-terminale Bereich, der für die direkte Interaktion mit den Cyclin-Boxen von CycT1 notwendig ist, nimmt eine stabile coiled coil Faltung ein und besitzt *in vitro* eine Affinität zu CycT1 mit einer Dissoziationskonstante im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Notwendigkeit dieser als Cyclin T-bindende Domäne (TBD) bezeichneten Region für die Interaktion mit P-TEFb und Inhibierung der Transkriptionsaktivität konnte *in vivo* bestätigt werden. Dabei weisen die Zelltransfektionsdaten auf eine besondere Bedeutung des Segments zwischen Aminosäuren 286 und 314 innerhalb der TBD hin, da das N-terminale Fragment (1-286) die Fähigkeit zur CycT1 Bindung verliert, das längere Fragment (1-314) aber noch mit CycT1 assoziiert. Im gleichen Maße war das um die TBD verkürzte N-terminale Fragment (1-286) ungeeignet, P-TEFb vermittelte Transkription zu inhibieren, so dass die CycT1 Bindung von Hexim1 für das Blockieren der Kinaseaktivität von Cdk9 notwendig ist.

Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie zeigen eine scharfen Elutionspeak für die TBD, der auch nach starker Verdünnung der Proteinlösung dieselbe Form und Retentionszeit beibehält. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die TBD entweder ein stark elliptisch geformtes Molekül darstellt oder ein definiertes, hochaffines Oligomer ausbildet. In ITC Experimenten wurde für die Dissoziation der TBD in Puffer eine Multimerisierungskonstante von fast 800 μM mit einer Stöchiometrie von zwei bestimmt. Diese geringe Affinität deutet auf ein höherwertiges Oligomer hin, dessen relativ schwache Interaktion jedoch nicht als Erklärung für das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie ausreicht. Im Verlaufe der biochemischen Charakterisierung der TBD wurde mit NMR spektroskopischen Methoden die Struktur bestimmt, die eine dimere coiled coil Faltung zeigt. Diese Struktur ist stark elongiert und bildet ein paralleles Homodimer, was das Laufverhalten des Moleküls in der Größenausschlusschromatographie zu frühen Retentionszeiten deutlich macht. Damit kann die Multimerisierungskonstante aus den ITC Experimenten als der Übergang eines Tetramers zu zwei stabilen coiled coil Dimeren interpretiert werden. Eine starke Assoziation der beiden monomeren Ketten in der coiled coil Struktur der TBD würde ebenso die Ergebnisse der pulldown Experimente erklären, die zeigten, dass die einzelne TBD nur schwach mit GST-markierter TBD kopräzipitierte. Aufgrund einer starken Assoziation ermöglicht das GST-TBD Dimer nur einen sehr schwachen Austausch mit freier TBD. Im Gegensatz dazu ist die dimere Interaktion in nativem Hexim1 schwächer, so dass volllängen Hexim1 effizient mit volllängen GST-

Hexim1 kopräzipitierte. Übereinstimmend damit wurde gezeigt, dass natives Hexim1 sowohl isoliert als auch im Komplex mit P-TEFb und 7SK snRNA einen funktionalen Dimer bildet (Li et al., 2005).

In zwei unabhängigen Fluoreszenz-spektroskopischen Experimenten wurde die Bindungsaffinität zwischen der TBD (255-359) und CycT1 (1-292) bestimmt. Verglichen mit einer Dissoziationskonstanten von 2.6 μM , die in den Gleichgewichts-Fluoreszenzexperimenten bestimmt wurde, liegt der Wert der stopped flow Messungen mit 0.56 μM etwas niedriger und entspricht einer vierfach höheren Affinität. Im Einklang damit lieferten ITC Messungen eine Dissoziationskonstante von 1.6 μM für die CycT1-Hexim1 Interaktion, so dass alle drei Techniken ähnliche Werte im Bereich der tolerierten Abweichungen liefern. Im zellulären Kontext der volllängen Proteine und mit den obligaten Partnern Cdk9 für CycT1 und 7SK snRNA für Hexim1 kann die Affinität jedoch noch erhöht sein. Die Kinetik der Bindung zeigte einen einfachen exponentiellen Zusammenhang, so dass die Messwerte für eine direkte Bindung der isolierten Domänen sprechen.

Mutationsstudien zur Cyclin T1-Hexim1 Interaktion

Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass die TBD in Hexim1 über ein negativ geladenes Cluster mit CycT1 assoziiert. Dieses Cluster befindet sich auf dem N-terminalen Segment der coiled coil Struktur der TBD (Dames et al., 2006). Analog zu den Ergebnissen aus den *in vivo* Studien, die zeigten, dass ein C-terminal verkürztes Hexim1 Konstrukt (1-314) noch P-TEFb Transkriptionsaktivierung inhibiert (Schulte et al., 2005), wurde in Bindungsexperimenten *in vitro* mit C-terminal verkürzter TBD (255-316) gezeigt, dass dieses Fragment ohne das zweite coiled coil Segment noch CycT1 bindet. Dagegen ist die Inhibierung deutlich schwächer, wenn im volllängen Hexim1 Protein die Reste L287R und L294R in Gegenwart von 7SK snRNA mutiert werden (Li et al., 2005). Aus der Hexim1-TBD Struktur können wir jedoch schließen, dass diese Mutationen nicht durch direkte Bindung die Interaktion mit P-TEFb beeinflussen, sondern vielmehr die Struktur und Stabilität des ersten coiled coil Segments verändert wird, da die beiden Leuzin Reste an den d-Positionen der Heptad Wiederholungen liegen. Die Vollständigkeit und Integrität des ersten coiled coil Segments sowie die charakteristische Ladungsverteilung negativer Aminosäuren auf der Oberfläche der Domäne scheinen also für die Inhibierung von P-TEFb durch Hexim1 notwendig zu sein.

Um den Einfluss einzelner Reste in Hexim1 auf ihre Affinität zu CycT1 hin zu untersuchen, wurden Aminosäuren auf der Oberfläche der coiled coil Struktur im ersten Segment zu Alanin mutiert. In einem stopped flow Dissoziationsassay konnte durch Verdrängung der Fluoreszenzmarkierten wildtyp TBD durch einen Überschuss an unmarkierten Mutantenproteinen so die individuellen Bindungskonstanten zu CycT1 bestimmt werden. Während die Mutation einzelner Aminosäuren zumeist nur geringe Effekte zeigte, führte die Aufhebung negativer Ladungsreste zu einer reduzierten Assoziation der Interaktion, was insbesondere für die Tripelmutante dreier Glutaminsäuren deutlich wurde. Der Verlust der elektrostatischen Assoziation durch die Mutation eines polaren Clusters auf der Bindungsoberfläche der TBD legt die Vermutung nahe, dass diese mit Resten entgegengesetzter Ladung in CycT1 interagieren. Eine positiv geladene Region (TRM) in den Cyclin-Boxen von CycT1, für die gezeigt wurde, dass sie in die HIV-1 Tat/TAR Interaktion involviert ist (Garber et al., 1998), wurde daraufhin für Bindungsstudien mit Hexim1-TBD mutiert. Die für diese CycT1(KR4A) Mutante beobachtete Verringerung der Affinität um den Faktor 20, die aus

einer sechsfachen Abnahme der Assoziationsratenkonstante und einer etwa dreifachen Zunahme der Dissoziationsratenkonstante resultiert, konnte die Annahme einer elektrostatischen Interaktion untermauert werden. In weiterer Übereinstimmung damit ist in der CycT1 Struktur erkennbar, dass die positiven Reste des TRM Motivs auf der Oberfläche exponiert sind. Der Einfluss der positiv geladenen Reste in CycT1 auf die Hexim1-TBD Bindung unterstützen darüberhinaus die im folgenden beschriebenen Beobachtungen einer wechselseitig exklusiven Bindungsoberfläche für Hexim1-TBD oder HIV-1 Tat, in denen die Interaktionsflächen auf eine ähnliche Region in CycT1 kartiert wurden.

Kompetition der Bindung von Tat und Hexim1 an Cyclin T1

Für die Tat/CycT1 Interaktion ist gezeigt worden, dass eine optimale Bindung von Tat an CycT1 die Ausbildung eines intermolekularen Zinkfingers erfordert und dass Reste am C-terminalen Rand der Cyclin-Boxen (Tat/TAR recognition motif, TRM) notwendig sind (Garber et al., 1998). In dieser Arbeit wurde die Bindung des Hexim1 Proteins an CycT1 mit der Interaktion des viralen transaktivierenden Faktors Tat verglichen. In Präzipitationsassays mit GST-markiertem CycT1 konnte zunächst sowohl Tat als auch Hexim1-TBD aus dem Überstand koeluiert werden, was die gleichzeitige Bindung oder eine ähnliche Bindungsaffinität beider Proteine zu CycT1 vermuten lässt. Jedoch kann ein CycT1-Tat Fusionsprotein Hexim1 nicht mehr binden und in einem unabhängigen pulldown Assay assoziierte nur CycT1 aber nicht Hexim1 mit dem immobilisierten GST-Tat Protein. Damit kann eine wechselseitig exklusive Bindung zwischen CycT1 und Hexim1 oder CycT1 und Tat beschrieben werden, die sich entweder aufgrund einer ähnlichen Bindungsoberfläche oder wegen sterischer Hinderung ausschließen. In der Literatur sind Dissoziationskonstanten von 9 und 0.4 nM für die CycT1 (1-303)/Tat Interaktion ohne RNA und in Gegenwart der TAR RNA beschrieben (Zhang et al., 2000). Da diese Affinität 100-fach stärker im Vergleich zu der hier bestimmten CycT1/TBD Assoziation ist, müsste das Tat Protein auch in den pulldown Experimenten eine viel stärkere Bindung zeigen. Eine mögliche Ursache für die hier beobachtete unvollständige Verdrängung von Hexim1-TBD von CycT1 durch HIV-1 Tat könnte ein gewisser Anteil an denaturierten Tat Molekülen sein oder die unvollständige Ausbildung der Zinkfinger in dem rekombinant exprimierten Protein.

Weiteren Aufschluss über die Komplexbildung zwischen CycT1, Hexim1 und HIV-1 Tat gaben die Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration. Hier zeigte sich ebenso, dass kein ternärer Komplex gebildet wird, während die Kombination aus CycT1-TBD und CycT1-Tat jeweils einen stabilen binären Komplex im Experiment zeigte. Das Laufverhalten eines großen Komplexes würde bei erheblich früheren Retentionszeiten erwartet werden. Stattdessen konnte beobachtet werden, dass nach Zugabe aller drei Moleküle der CycT1-Tat Komplex überwiegt und nur eine kleine Fraktion im CycT1-Hexim1 gebundenen Zustand vorliegt. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den Präzipitationsdaten und legen wiederum nahe, dass zwar eine wechselseitig exklusive Interaktion von CycT1 zu Hexim1 oder Tat vorliegt, die Bindungsaffinitäten aber nicht sehr voneinander verschieden sind. Zur weiteren Aufklärung dieser Interaktionen wäre es möglich ein Fluoreszenz-Kompetitionsexperiment aufzubauen, ähnlich wie es für die Analyse der TBD Mutanten hier angewendet wurde. Dabei könnte fluoreszenz-markiertes Hexim1 von der Bindung an CycT1 durch Zugaben von Tat in unterschiedlichen Konzentrationen verdrängt werden. Dieses Experiment könnte

sowohl in der Gleichgewichtstitration als auch mit der stopped flow Technik durchgeführt werden. Wünschenswert wäre darüber hinaus die Einbeziehung der jeweiligen obligaten RNA Bindungspartner 7SK und TAR. Die so erhaltenen Komplexe wären durch die RNA stabilisiert, was insbesondere der Strukturausbildung von Tat zugute käme.

Mögliche Mechanismen der Inhibierung von P-TEFb durch 7SK snRNA und Hexim1

Zur Inhibierung des P-TEFb Komplexes muss die Phosphorylierungsaktivität von Cdk9 blockiert werden. Der C-Terminus in Hexim1, die hier identifizierte TBD, bindet an CycT1 und ist für die Inhibierung *in vivo* notwendig (Schulte et al., 2005). Eine 7SK RNA unabhängige Inaktivierung wird durch Deletion des N-Terminus von Hexim1 erreicht (Li et al., 2005; Michels et al., 2004). Damit stellt sich die Frage, wie Hexim1 die Kinaseaktivität von Cdk9 inhibiert.

Zwei verschiedene Mechanismen der Inhibierung Cyclin-abhängiger Kinasen sind bisher strukturell aufgeklärt (Pavletich, 1999). Der Inhibitor p27^{CIP} nimmt nach Assoziation mit Cdk2/Cyclin A eine ausgedehnte Struktur an, die sowohl mit der Kinase als auch mit Cyclin A interagiert. Eine Tyrosinseitenkette des Inhibitors ragt dabei in die ATP Bindungstasche der aktivierten Kinase und blockiert so die ATP Bindung. Im Unterschied dazu verhindert die Bindung der INK Inhibitorfamilie an die Kinase die Assoziation mit dem entsprechenden Cyclin. Da Hexim1 und 7SK beide Untereinheiten von P-TEFb präzipitieren (Yik et al., 2003; Michels et al., 2004), kann ein Inhibierungsmechanismus ähnlich der INK Familie ausgeschlossen werden. Jedoch könnten unstrukturierte Bereiche in Hexim1 N-terminal zur TBD einen sequentiellen induced-fit Bindungsmechanismus ausüben, vergleichbar wie er für p27^{CIP} Inhibitoren gezeigt wurde (Lacy et al., 2004). Im Einklang mit dieser Vermutung wurde gezeigt, dass ein konserviertes Motiv in Hexim1, das PYNT Motiv (Aminosäuren 202-205), für die Assoziation mit P-TEFb von Bedeutung ist (Michels et al., 2004). Ebenso wurde gezeigt, dass die Reste Y271 und F208 notwendig für die Inhibierung der Kinase sind, die Komplexbildung nach Mutation aber nicht verhindern (Li et al., 2005). Die Mutation der Reste Y203 und T205 dagegen verhindert sogar die Assoziation des inhibierenden Komplexes (Michels et al., 2004).

Ein Vergleich mit p27^{CIP} lässt vermuten, dass die Tyrosine Y203 oder/und Y271 in Hexim1 die ATP Bindungsstelle von Cdk9 besetzen könnten. In diesem Modell würde die Assoziation der TBD mit CycT1 eine Art Erkennungsdomäne darstellen, die die Assemblierung des P-TEFb Komplexes mit 7SK snRNA und Hexim1 induziert, um dann mit unstrukturierten Regionen nahe der TBD das Cyclin-Kinasen Paar großflächig zu binden. Analog dazu bindet p27^{CIP} das Cyclin über ein konserviertes RxL Motiv, entfaltet anschließend eine verlängerte Sequenz von ca. 70 Resten, die die Cdk2/CycA Oberfläche bedeckt (Lacy et al., 2004; Russo et al., 1996) und kann dann die Kinase an der Nukleotidbindungsstelle mit dem konservierten Tyrosin (Y88) inhibieren (Abb. 44B). Die Erkennung des Cyclins stellt die Spezifität des Inhibitors für ein bestimmtes Cyclin/Cdk Paar dar, während die eigentliche Inhibierung durch Verdeckung der ATP Bindungsstelle in vielen Kinasen in gleicher Weise stattfindet. Im Falle von Hexim1 würde die Inhibierung mit einer ähnlichen Bindungsweise mindestens 20 zusätzliche Reste erfordern, die sich zwischen der CycT1 Bindungsstelle und den Tyrosinen, die die ATP Tasche blockieren sollen, befinden müssten. Übereinstimmend dazu

konnte gezeigt werden, dass der Bereich von 242 bis 276 in Hexim1, welcher N-terminal zur coiled coil Struktur liegt, flexibel ist (Dames et al., 2006).

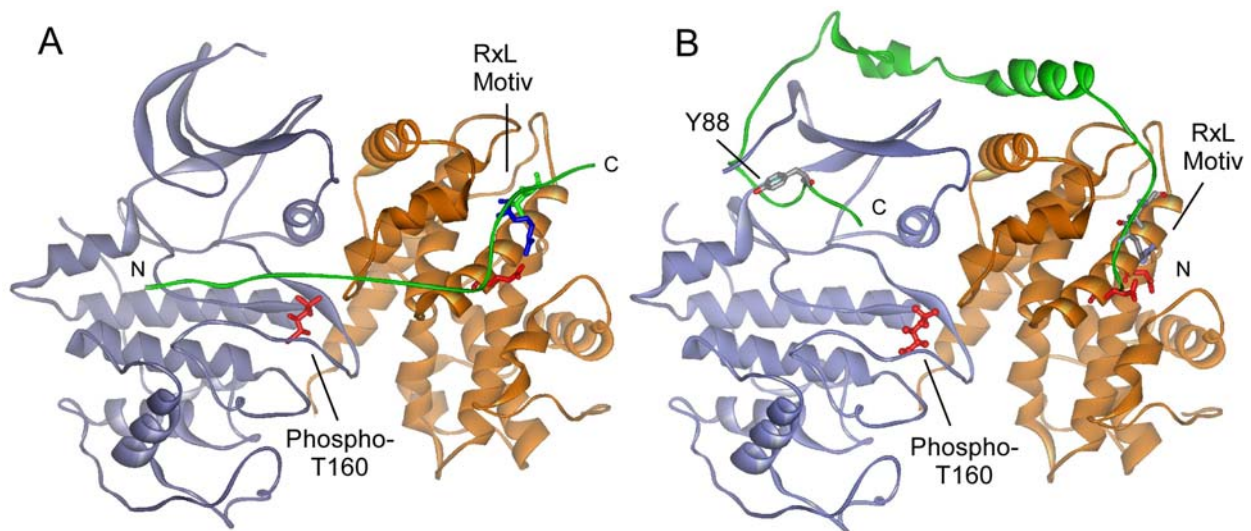


Abbildung 44: Vergleich der Substrat- und Inhibitorbindung in Cdk2/CyclinA. (A) Darstellung der Substratbindung an Cdk2/CyclinA (Cheng et al., 2006; 2CCI). Cyclin A ist braun, Cdk2 blau und das 30 Aminosäuren lange Substratpeptid in grün dargestellt. Hervorgehoben sind jeweils das Phosphothreonin T160 in Cdk2 und das RxL Motiv des Rekrutierungspeptids. Das gebundene ATP der Kinase fehlt in dieser Darstellung. (B) Darstellung des Cdk2/CyclinA/p27^{CIP} Komplexes (Russo et al., 1996; 1JSU). Die Farbkodierung ist der in (A) angeglichen, wobei zusätzlich das Tyrosin T88 des p27^{CIP} Inhibitors hervorgehoben ist.

Die Hexim1 Bindungsstelle auf CycT1 könnte in einer Furche liegen, die sich nahe der TRM Region der C-terminalen Helices der Cyclin-Boxen befindet. Dann müsste der Abstand dieser CycT1 Bindungsstelle zu einem möglichen katalytisch repressiven Motiv sehr groß sein, da die ATP-Bindungsstelle räumlich weit von der C-terminalen Helix der Cyclinbox entfernt liegt. Alternativ könnte Hexim1 mit der C-terminalen Helix der Cyclinbox Faltung in CycT1 ein trimeres coiled coil Segment bilden. Eine weitere Möglichkeit der Inhibierung durch Hexim1 stellt die allosterische Hemmung der Kinaseaktivität dar. Hexim1 könnte durch Assoziation mit dem CycT1/Cdk9 Heterodimer die Konformation der aktiven Stelle in Cdk9 so verändern, dass Substrate nicht mehr binden oder phosphoryliert werden können. Möglicherweise verdrängt Hexim1 dabei die C-terminale Helix der Cyclinbox, die die Spezifität und Funktion des Cyclin/Cdk Paares bestimmt.

Substratbindung an P-TEFb

Für Substratbindung ist die Assoziation der Kinase mit ihrem Cyclin notwendig, wodurch die ATP Bindungstasche zugänglich wird. Zur Bindung des Substrats ist zunächst die Aktivierung der Kinase durch Phosphorylierung eines konservierten Threonins notwendig, was Konformationsänderungen der N-terminalen Region induziert. In Cdk2/Cyclin A assoziieren beide Komplexpartner analog zur p27^{CIP} Inhibitorbindung mit dem Substrat (Abb. 44A). Die Struktur von Cdk2/CyclinA wurde 1999 jeweils in Komplex mit einem Substratpeptid und einem Rekrutierungspeptid gelöst (Brown et al.,

1999). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die verbindenden Reste zwischen den beiden Motiven unstrukturiert vorliegen (Cheng et al., 2006). Das Substratpeptid mit der Sequenz HHASPRK bindet die Kinase Cdk2 in einer ausgedehnten Konformation über die katalytische Tasche und kontaktiert nur die C-terminale Region in Cdk2, hauptsächlich das Aktivierungssegment (145-172). Mit dem Cyclin assoziiert das Substrat über ein konserviertes RxL Motiv. Im Gegensatz zum p27^{CIP} Inhibitor, der das RxL Motiv N-terminal trägt, liegt das Rekrutierungsmotiv im hier gezeigten Substrat p107 C-terminal zu dem phosphorylierbaren Serin (Abb. 44). Reste des Substrats p107 (658-668), die das RxL Motiv beinhalten, binden Cyclin A. Das sogenannte Rekrutierungspeptid assoziiert mit hydrophoben Resten der Helices H1 und H3 von Cyclin A. Zusätzlich bildet das Arginin aus dem RxL Motiv ionische Wechselwirkungen mit einem Glutamat (E220 in Cyclin A) aus. Diese Reste waren als konservierte Reste in Cyclin A, E und B identifiziert und spielen in gleicher Weise eine Rolle in der Inhibitorbindung mit p27^{CIP} (Lacy et al., 2004). In CycT1 ist an entsprechender Position ebenfalls ein negativ geladener Rest (D47), so dass in ähnlicher Weise die Erkennung eines RxL Motivs vermutet werden kann. Das natürliche Substrat der Kinase Cdk9 stellt die CTD der RNA Pol II dar. In den 52 Heptad repeats der Sequenz YSPTSPS werden die Ser2 phosphoryliert. Das RxL Motiv kann in der Sequenz nicht identifiziert werden. Von hohem Interesse wäre die Identifizierung eines RxL Motivs in dem inhibierenden Hexim1 Protein, was bisher aufgrund der geringen Konsensusanforderungen nicht eindeutig vorhergesagt werden kann.

Die funktionale Rolle der 7SK als Inhibitor von P-TEFb

Die funktionale Rolle der 7SK snRNA als Cdk Inhibitor muss noch geklärt werden, wobei angenommen wird, dass im inhibierten Komplex nur ein 7SK snRNA Molekül existiert. Während Hexim1 P-TEFb durch eine direkte Interaktion mit CycT1 über seine C-terminale Region bindet, dient die 7SK snRNA vermutlich als molekulares Gerüst, um Hexim1/CycT1 Assoziation zu ermöglichen. In RNA Kartierungsexperimenten (Egloff et al., 2006) wurde gezeigt, dass für eine *in vivo* Ausbildung des inhibierenden P-TEFb/Hexim1/7SK Komplexes und die Inhibierung der RNA Pol II Transkription zwei distinkte Bereiche in der 7SK snRNA notwendig sind: ein distales Segment der 5'-Haarnadel-schleife und die apikale Domäne der 3'-Haarnadelschleife. Während das 5'-Element für die P-TEFb und Hexim1 Interaktion notwendig ist, spielt die 3'-Haarnadelschleife eine Rolle in der Rekrutierung von P-TEFb. Die Funktionen der inneren Sequenzen sind bisher nicht bekannt, obwohl sie aufgrund einiger hochkonservierter Bereiche mögliche funktionale Aufgaben besitzen (Abb. 45A). Hexim1 ist als Adaptorprotein beschrieben worden, das entweder die P-TEFb/7SK Interaktion vermittelt (Michels et al., 2004) oder die direkte Assoziation von P-TEFb an 7SK ermöglicht (Yik et al., 2004). In ähnlicher Weise wird die TAR RNA Bindung an CycT1 durch Tat intensiviert. Aufgrund einer stark kooperativen Assoziation erhöht Tat Bindung an CycT1 die Affinität für die TAR RNA drastisch (Karn, 1999).

Tat und Hexim1 besitzen beide Arginin-reiche, RNA-bindende Motive und binden die Cyclin-Boxen von CycT1, wobei die 7SK snRNA über zwei strukturell distinkte Bereiche assoziiert und die TAR RNA nur ein Strukturelement ausbildet (Egloff et al., 2006). In CycT1 binden Reste (252-261) die Nukleotide im zentralen Loop der TAR (Karn, 1999). Interessanterweise wurde eine

überlappende Region in CycT1 für 7SK Bindung bestimmt (255-333) (Chen et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen ähnliche strukturelle Voraussetzungen für die Bindung von P-TEFb an die 3'-Haarnadelschleife in 7SK RNA und an die TAR RNA vermuten. Die Motive für P-TEFb Bindung zeigen ebenfalls Gemeinsamkeiten. Die 7SK 3'-Haarnadelschleife besitzt zwei kurze Doppelstränge, die durch zwei ausgestülpte Reste voneinander getrennt werden, und eine 5 nt lange Stammschleife, wobei die Sequenz des Loops, des angrenzenden Doppelstrangs und der Ausstülpung für die Bindung an P-TEFb kritisch sind (Egloff et al., 2006). Die HIV TAR RNA ist aus einem 6 nt langen Loop und einer 3 nt großen Ausstülpung aufgebaut (Abb. 45B). In nachfolgenden Versuchen soll die 3'-Haarnadelschleife der 7SK RNA synthetisiert werden und der Komplex aus CycT1, Hexim1 und 7SK RNA generiert werden.

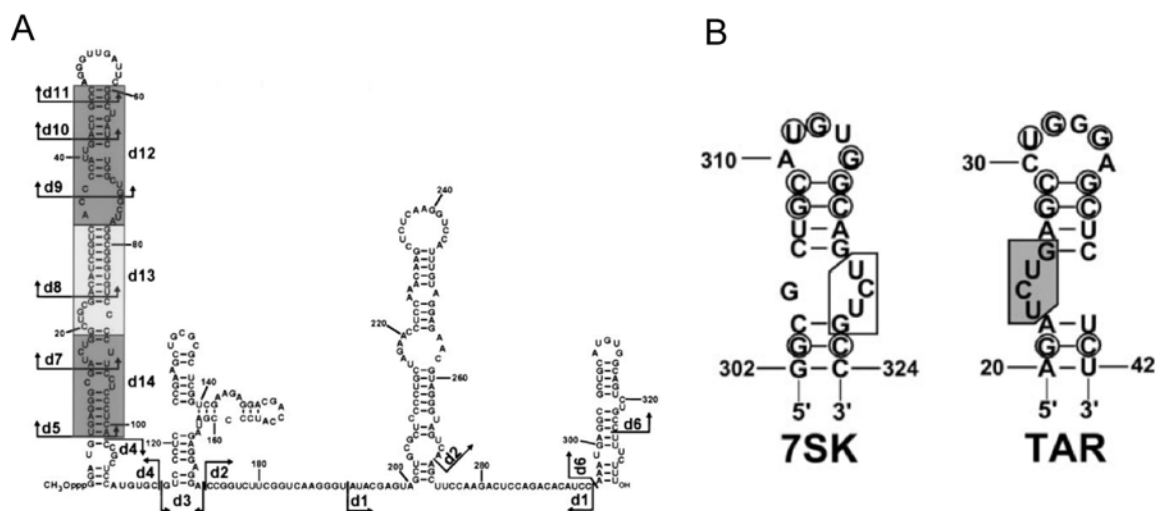


Abbildung 45: Struktur der 7SK snRNA und Strukturvergleich des apikalen Segments der HIV TAR RNA mit dem apikalen Segment der 7SK snRNA. (A) Zwei distinkte Bereiche der 7SK snRNA sind notwendig für *in vivo* Bindung von P-TEFb: die 5'- und die 3'-Haarnadelschleife. **(B)** Konservierte Nukleotide sind eingekreist, die für Tat-Bindung notwendigen Reste sind grau unterlegt und die entsprechenden der 7SK snRNA mit einem Kasten gekennzeichnet (entnommen aus Egloff et al., 2006).

Formierung des Cyclin T1/Tat/TAR RNA Komplexes

Zur Ausbildung des ternären transaktivierenden Komplexes aus CycT1, Tat und TAR RNA wurden verschiedenen Fusionskonstrukte aus CycT1 und Tat eingesetzt, die über einen Glycin-reichen Linker miteinander verknüpft wurden. Dabei wurde aus Gründen der Stabilität zunächst EIAV Tat Protein exprimiert und die entsprechende equine TAR RNA synthetisiert. Die Faltung und Ausbildung des intermolekularen Zinkfingers im CycT1-Tat Komplex konnte in Gelverschiebungsexperimenten (EMSA) gezeigt werden. Dieser Assay ermöglicht die Analyse der Ausbildung eines ternären Komplexes und eine Kontrolle der Einstellung eines vollständig gesättigten homogenen Komplexes, der für die Kristallisation notwendig ist.

Garber et al. (1998) haben in Mutationsstudien, die in die Tat/TAR Bindung involvierten Reste in CycT1 identifiziert. Tat Bindung an CycT1 erfordert die vollständige Cyclin-Box Struktur und die C-terminal angrenzende TRM Region (250-262). Für Tat Bindung sind N250, R259 und C261 von Bedeutung, wohingegen TAR Assoziation über die Reste R251, L252, R254, I255 und W258

geschieht. Arginin Reste sind häufig in Protein/RNA Interaktion involviert. Hydrophobe Reste wie L und W können RNA-Rückgrat Kontakte ausüben. Tat galt lange Zeit als Rekrutierungshelfer für P-TEFb zur Aktivierung der Transkription langer HIV RNA Transkripte. Bis vor kurzem war es noch unklar, ob Tat auch P-TEFb aus dem inhibierten Komplex rekrutiert. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass Tat nicht nur die Rekrutierung ausführt, sondern den Pool an aktiven P-TEFb Molekülen für HIV Transkription erhöhen kann. Diese Annahme wird durch die Existenz einer kompetitiven Bindung und der Ähnlichkeiten in der molekularen Protein/RNA Konfiguration untermauert. Bindet das Tat Protein an dieselbe Region in CycT1, aber mit einer erhöhten Affinität, kann es Hexim1 von CycT1 verdrängen und so durch seine eigene Bindung die Bildung neuer P-TEFb/Hexim1/7SK snRNA Komplexe verhindern sowie bestehende aufheben.

HIV-1 hat durch das Tat Transaktivierungsprotein einen effizienten Mechanismus entwickelt, die negative Regulation von P-TEFb aufzuheben, indem es P-TEFb aus dem inhibierten Komplex zur Transkription der eigenen Gene an die RNA Pol II entführt. Obwohl rekrutiertes P-TEFb aus dem Hexim1/7SK snRNA Komplex einem inhibierten Komplex entstammt, muss es zur schnellen, effizienten Transkription der viralen Gene vollständig aktiv sein. Die Aktivität wird zusätzlich zur Bindung von Cdk9 an CycT1 durch eine vorhergehende Phosphorylierung am konservierten Threonin 186 an der Spitze der T-Schleife erreicht (Shen et al., 2004; Li et al., 2005). Dieses Ereignis ist entscheidend für die Aktivierung der Cdk's, da durch Phosphorylierung die katalytische Tasche in Cdk9 eine für Kinasenaktivität notwendige, offene Konformation einnimmt.

5.2 Struktur der N-terminalen Domänen von FHOD1

Domänenarchitektur in FHOD1 (1-377)

In dieser Studie wurden die Strukturen der N-terminalen Domänen des humanen Forminproteins FHOD1 bestimmt. Die ersten 115 Reste nehmen eine Ubiquitinsuperfaltung an, die eine für Formine bisher einzigartige Ras-bindende Domäne (RBD) erkennen lässt und Einblicke in die Mechanismen der Autoinhibierung und Aktivierung bei FHOD1 gibt. Unmittelbar an die RBD angrenzend besitzt FHOD1 eine Domäne mit einer Armadillorepeatfaltung, die in Diaphanous-verwandten Forminen als FH3 Domäne konserviert ist. In gleicher Weise ist in FHOD1 die autoregulatorische Domäne am C-Terminus konserviert, die mit dem N-Terminus interagiert (Gasteier et al., 2003; Schonichen et al., 2006) und so im nativen Zustand eine autoinhibierte Konformation einnimmt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass in mDia1 die GTPase in der Nähe der DAD Bindungsstelle auf der FH3 Domäne bindet (Rose et al., 2005; Lammers et al., 2005). Durch so erzeugte Konformationsänderungen wird die DAD-FH3 Interaktion destabilisiert. Die DAD und die GTPase binden kompetitiv und erst nach der Verdrängung der DAD wird die FH2-Domäne zugänglich und kann *in vitro* Aktin nukleieren (Lammers et al., 2005; Nezami et al., 2006).

Die FH3 Domänenstruktur (116-339) bildet in Forminen die Interaktionsfläche zur DAD und induziert so Autoinhibierung. Die entsprechende inhibierte Komplexstruktur für FHOD1 konnte in dieser Arbeit noch nicht gelöst werden, wenngleich erste Kristallisationsansätze vielversprechend aussehen. Die strukturelle Ähnlichkeit zur mDia1 FH3 Domäne (Lammers et al., 2005) lässt aber

vermuten, dass die konservierten Reste der DAD in ähnlicher Weise an die FHOD1 FH3 Domäne binden. Spezifische Aminosäuren in der Bindungsoberfläche unterscheiden sich allerdings voneinander, so dass zu vermuten ist, dass die DAD in FHOD1 möglicherweise um einen Helixbogen oder sogar einen ganzen Armadillorepeat verschoben bindet. In der elektrostatischen Oberflächendarstellung wird deutlich, dass negativ geladene Reste insbesondere der beiden C-terminalen Armadillopeats mit dem basischen Motiv der DAD interagieren könnten. Die vermutete DAD Bindungsstelle auf der FH3 Domäne in FHOD1 sollte jedoch durch weitere Mutagenesestudien untersucht werden, da die Sequenzhomologie zu der mDia1 Komplexstruktur zu gering ist, um die Struktur der Komplexbildung zuverlässig vorherzusagen.

Die Existenz einer RBD am N-Terminus ist bisher noch für kein anderes Forminprotein weder aus Sequenzvorhersagen noch strukturell gezeigt worden. Erstaunlicherweise unterscheidet sich die N-terminale Domänenstruktur in FHOD1 hinsichtlich ihrer GTPase-bindenden Domäne stark von der einzig anderen bisher bekannten Forminstruktur, mDia1 (Rose et al., 2005). In der Struktur von mDia1 bildet die N-terminale, RhoA-bindende GBD eine α -helikale Struktur bestehend aus drei kurzen Helices aus. Schon 2001 wurde vermutet, dass die FHOD1 Domänenarchitektur sich von anderen Diaphanous verwandten Forminen unterscheidet (Westendorf, 2001). In dieser Arbeit wurde allerdings beschrieben, dass sich die GTP-bindende Region in FHOD1 in dem Bereich (470-570) befindet. Dabei wurde gefunden, dass der C-Terminus von Rac1 für die Bindung verantwortlich ist und nicht der Effektorloop. Im Einklang damit wurde auch gezeigt, dass diese Bindung unabhängig vom Nukleotidzustand der GTPase ist. Diese Beobachtung weicht vom Mechanismus der Regulation in anderen DRF's, wie zum Beispiel mDia, deutlich ab. Dort wird die Autoregulation von mDia1 nur im Triphosphat-gebundenen Zustand von RhoA aufgehoben (Alberts, 2001). Da Rho-GTPasen als molekulare Schalter fungieren, erscheint ein solcher Mechanismus biologisch naheliegend. Die hier bestimmte RBD Struktur am N-Terminus von FHOD1 wirft die Frage auf, ob noch eine zweite unabhängige GTPasen Bindungsstelle in FHOD1 existiert und stellt die früheren Ergebnisse zur Funktion des mittleren Fragments (470-570) in Frage.

Die N-terminalen 115 Aminosäuren bilden eine RBD

Unerwarteterweise nimmt die N-terminale Domäne (1-115) in FHOD1 einen Ubiquitin-Superfold an. Funktional wird diese Faltung in fünf Unterfamilien gegliedert (Kiel and Serrano, 2006). Die Domäne in FHOD1 zeigt Charakteristika einer Ras-bindenden Domäne aufgrund eines charakteristischen Musters positiv geladener Aminosäuren auf der Oberfläche der Struktur. Die Identifizierung einer spezifischen GTPase für die RBD Bindung würde diese Annahme untermauern. RBD's binden klassischerweise als Effektoren Ras-Proteine (Nassar et al., 1995). Aktivierte Ras-Proteine nehmen an der Signaltransduktion in Zellen teil, wobei sie als Antwort auf verschiedenste extrazelluläre Stimuli mit vielen, katalytisch diversen „downstream“ Effektoren interagieren, welche die Genexpression, die Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und das Überleben der Zelle kontrollieren. Ras Effektoren bilden eine spezifische Unterdomäne in Proteinen, die ansonsten in ihrer Domänenarchitektur keine weitere Beziehung aufweisen müssen. Die Art der Interaktion zu den GTPasen ist aber bei allen bisher gelösten Ras-Effektorstrukturen ähnlich, dennoch stark unterschiedlich zu anderen GTPasen Effektoren (siehe GBD in mDia1). Ras-Proteine sind

Schlüsselbestandteile der intrazellulären Signalwege und regulieren so Zellwachstum und Differenzierung. GTPasen der Rho/Rac-Familie hingegen kontrollieren das Zytoskelett. Bisher ist gezeigt worden, dass Formine durch Rho-Familie-GTPasen aktiviert werden. Rho-GTPasen haben eine bedeutende Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts. Exemplarisch ist für mDia1 gezeigt worden, dass die GTPase RhoA mit dem N-Terminus von mDia1 assoziiert und so die Autoinhibierung aufgehoben werden kann (Alberts, 2001; Rose et al., 2005).

Für FHOD1 wurde bisher angenommen, die aktivierende GTPase sei Rac1 und erstaunlicherweise wurde die GTP-bindende Domäne für FHOD1 auf den strukturell noch unbekanntem mittleren Bereich des Proteins determiniert (Westendorf et al., 2001). Rac1 ist ebenso wie RhoA für seine Rolle in der Regulierung des Zytoskeletts bekannt. Es ist noch unklar, welche molekularen Signale die Autoinhibierung in FHOD1 aufheben. Die Identifizierung einer RBD in FHOD1 lässt die Frage nach ihrer Funktion aufkommen. Könnte eine Ras-GTPase als typisches Merkmal einer RBD oder aber eine für Formine erwartete Rho-GTPase der spezifische Bindungs-partner sein? Möglicherweise bindet die RBD in FHOD1 *in vivo* tatsächlich Rac1 oder eine andere Rhofamilie-GTPase zur Aktivierung der Aktinnukleierung. Andererseits könnte die RBD eine Affinität für Ras-Proteine zeigen. Dann sollte die mögliche Existenz zweier Bindungsstellen für zwei spezifische GTPasen untersucht werden. Wenn in diesem Fall Rac1 Bindung im zentralen Bereich von FHOD1 die Autoinhibierung aufheben könnte, sollte die Ras Bindung am N-Terminus eine andere Funktion ausüben. So könnte die Verbindung von FHOD1 mit Ras womöglich eine Rolle in der Lokalisation des Proteins haben und FHOD1 an die Zellmembran geleiten. Ras-Proteine sind am C-Terminus über ein spezifisches CAAX Motiv farnesyliert, so dass sie in der Zelle membran-gebunden vorliegen (Rocks et al., 2005). Für FHOD1 wurde gezeigt, dass es an Zellmembranen lokalisiert (Gasteiner et al., 2003). Andererseits könnte FHOD1 durch Interaktion mit Ras in einen noch unbekanntem Signaltransduktionsweg involviert sein.

Ähnlichkeiten der FHOD1-RBD mit Ras-, PI3K- und B41/ERM-RBD Familien

Unter den Ras-Proteinen gibt es eine spezielle Variante, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts teilnimmt und M-Ras („Muscle-Ras“) genannt wird. Dieses Protein wurde in Versuchen, die Regulation der Muskelzellendifferenzierung aufzuklären, aus der cDNA Bank einer Maus Skelettmuskel-Zelllinie kloniert und aufgrund seiner sequentiellen Ähnlichkeiten der Ras-Superfamilie zugeordnet (Matsumoto et al., 1997). Es besitzt die konservierten kanonischen GTP/GDP-Bindungsmotive und GTPasen Aktivität, unterscheidet sich aber in spezifischen Resten innerhalb der Effektor-domäne von anderen Ras-Proteinen. M-Ras ist C-terminal über eine Geranylgeranyl-Gruppe mit der Zellmembran assoziiert. Wie bei anderen GTPasen agiert die G22V Mutante (G12V in Ras) als konstitutiv aktive Form. In Transfektionsversuchen mit M-Ras cDNA in Fibroblasten wurden Mikrospeikes induziert. Aktinstressfasern hingegen verschwanden und es bildeten sich stattdessen in der Zelle eine Vielzahl von Actinloci aus, so dass M-Ras eine Rolle in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts zugeschrieben wurde (Matsumoto et al., 1997).

Eine Besonderheit des M-Ras Proteins zeigt sich in seiner Kristallstruktur (Ye et al., 2005). Nukleotidaustausch in Ras-Proteinen resultiert typischerweise in Konformationsänderungen zweier Regionen, die als switch 1 und switch 2 bezeichnet werden (Geyer and Wittinghofer, 1997; Vetter

and Wittinghofer, 2001). Der Triphosphat-gebundene Zustand existiert darüberhinaus in zwei distinkten Konformationen: Zustand 2 ist die vorherrschende Form in H-Ras und stellt die „on“ Konformation dar, die im Komplex mit Effektoren gefunden wird (Geyer et al., 1996; Spoerner et al., 2001). In H-Ras wurde die Kristallstruktur allein und im Komplex mit Effektoren in der „on“-Konformation gelöst (Wittinghofer and Nassar, 1996). Zustand 1 entspricht im Gegensatz dazu der „off“ Konformation, deren Struktur in H-Ras bisher nicht aufgeklärt wurde, möglicherweise aber der Diphosphat-gebundenen Struktur entspricht. In ^{31}P NMR Studien konnte nun gezeigt werden, dass M-Ras vorherrschend die Konformation des Zustands 1 annimmt (Ye et al., 2005). Auch in der Kristallstruktur nimmt die switch 1 Region den sogenannten „off“ Zustand ein. Diese Tatsache erklärt, warum einige Effektordomänen (c-Raf-1, PI3K, RalGDS) viel schwächer mit M-Ras als mit H-Ras interagieren. Stattdessen besitzt M-Ras eigene zelluläre Effektoren und nimmt nach Bindung an diese die aktive Konformation 2 ein (Ye et al., 2005). Aufgrund dieser Charakteristika könnte M-Ras ein potentieller Kandidat für die FHOD1-RBD Assoziation darstellen, da es einerseits in die Regulation des Zytoskeletts involviert ist und andererseits erklären würde, warum in Bindungsversuchen Rac1 nukleotidunabhängig binden konnte (Westendorf et al., 2001). Eine naheliegende Möglichkeit wäre deshalb in einem *in vivo* Screening verschiedene GTPasen der Ras- und Rho-Familie durch Kotransfektion mit der RBD aus FHOD1 auf spezifische FHOD1 Bindung hin zu testen.

RBD's zeichnen sich durch ein charakteristisches Ladungsmuster aus, das die Spezifität für ein bestimmtes Protein der Ras-Superfamilie determiniert (Herrmann and Nassar, 1996). Die Assoziation von Ras mit einer RBD findet dabei immer unter Ausbildung eines intermolekularen β -Faltblatts statt. Die Superimposition der RBD von FHOD1 mit der RBD der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) (Pacold et al., 2000) ergibt einen RMSD Wert von 2.5 Å für die C_{α} -Hauptkette. PI3-Kinasen bilden eine Familie von ubiquitär vorkommenden Multidomänen-Proteinen, die in Signaltransduktion involviert sind und durch GTP-gebundenes Ras aktiviert werden. Ihre enzymatische Aktivität stellt die Phosphorylierung der 3-Hydroxylgruppen in Phosphinositol dar. Durch die Akkumulation von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ in Zellen an der Plasmamembran werden so eine Vielzahl von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -bindenden Proteinen zur Membran rekrutiert, die wiederum verschiedenste „downstream Signale“ initiieren. Ras Aktivierung von PI3K ist für das Überleben transformierender Zellen essentiell. Bisher einzigartig für Ras/RBD Interaktionen ist in der PI3K/Ras Assoziation neben der switch 1 Effektorregion von Ras auch die switch 2 Region der GTPase involviert (Pacold et al., 2000). Eine weitere Besonderheit ist eine ausgedehnte Schleife zwischen $\alpha 1$ und $\beta 3$ in PI3K, die in der singulären PI3K Struktur nicht strukturiert ist (Walker et al., 1999), dafür aber nach Ras-Bindung eine geordnete Struktur annimmt. Dies wird durch die Interaktion einiger Reste innerhalb der Schleife mit Ras induziert, die die Faltung dieser Schleife stabilisieren. Ein ähnlicher Vorgang ist für die FHOD-spezifische lange Schleife zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ bei der Bindung an eine GTPase vorstellbar, jedoch müsste dazu die intramolekulare Assoziation der Schleife mit der FH3 Domäne aufgehoben werden.

Eine weitere Familie der Ubiquitinfaltungsdomänen zeigt Übereinstimmungen zu der hier bestimmten Domäne aus FHOD1. B41/ERM Proteine bestehen aus drei Domänen, von denen die erste die Ubiquitinfaltung einnimmt. Diese B41 Domäne ist in der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)

Familie der eng verwandten Zytoskelett Proteine enthalten (Tsukita and Yonemura, 1999). Die Familie der ERM Proteine wurde zunächst identifiziert als Proteine, die in speziellen Membranstrukturen wie zum Beispiel in Zell-Zell-Verbindungen, angereichert sind (Berryman et al., 1993). Sie stellen eine Verbindung zwischen F-Aktin und Membran-assoziierten Proteinen dar, indem sie strukturelle und regulatorische Funktionen in der Assemblierung und Stabilisierung von spezialisierten Plasmamembran-Domänen ausüben. Für ein Protein der B41 Subdomänen Familie, Krit1, konnte bisher Ras- und Rap-Assoziation gezeigt werden (Serebriiskii et al., 1997). Die RBD homologe P1 Domäne in B41 Proteinen assoziiert intramolekular mit den zwei anderen P2 und P3 Domänen, wobei die Interaktionsfläche sich nicht mit einer möglichen Ras Interaktion überschneidet (Han et al., 2000). Im Unterschied zu FHOD1 besitzen die RBD's der B41 Faltung jedoch keine lange Schleife zwischen den $\beta 1$ und $\beta 2$ Faltblattsträngen. Der C-Terminus der ERM Proteine bindet F-Aktin, wohingegen der N-Terminus mit integralen Membranproteinen assoziiert. Generell werden ERM Proteine durch Rho-GTPasen aktiviert. Rho aktiviert eine Effektor kinase, die ERM Proteine zur Aktivierung phosphoryliert. Eine weitere Ähnlichkeit zu Forminen stellt eine Form der Autoinhibierung in ERM Proteinen dar, wenn durch Assoziation des N- und C-Terminus die Bindungsstellen für Aktin und membrangebundene Proteine nicht zugänglich sind.

Mögliche Funktionen der FHOD-spezifischen Schleife

Die einzigartige Schleife in der FHOD1-RBD zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ könnte eine wichtige Rolle in der Spezifität für die GTPase bilden. Die Längen der verbindenden Schleifen können in den Ubiquitin-faltungen stark variieren, was möglicherweise für die Spezifität der Interaktion mit anderen Proteinen oder die Modulierung der Assoziation mit anderen Domänen wichtig ist. Besonders die Schleifen, die nicht direkt im Zentrum an der Interaktion beteiligt sind, sondern an Randbereichen liegen, scheinen die Dynamik der Komplexbildung zu modulieren (Kiel and Serrano, 2006). In FHOD1 wird die N-terminale Schleife durch hydrophobe Interaktion von P28 und F29 mit dem ersten Repeat der FH3 Domäne fixiert. Möglicherweise ist aber eine Flexibilität dieser Schleife für GTPasen Bindung erforderlich, da insbesondere die beiden positiven Ladungsreste R38 und R39 unmittelbar vor $\beta 2$ an der Bindung beteiligt sein könnten. Im Kontext des Vollängenproteins ist dabei vorstellbar, dass diese Fixierung aufgehoben wird. Die Region N-terminal zur klassischen DAD könnte hier womöglich eine komplementäre Oberfläche bieten, so dass die Schleife Konformationswechsel eingehen könnte. Sollte diese Region (1011-1096) eine Rolle in der Aktivierung der FH2 Domäne spielen, wäre ihre Funktion als Subdomäne identifiziert und würde nicht wie bisher angenommen eine Verlängerung der FH2 Domäne darstellen. Eine Beteiligung dieses Bereichs an der klassischen DAD Funktion, nämlich der Bindung zur Autoinhibierung, wurde durch *in vitro* Bindungsexperimente und *in vivo* Transfektionen ausgeschlossen (Schönichen et al., 2006). Die begrenzte Flexibilität der Schleife, die in der Struktur ersichtlich wird, könnte erklären, warum in Bindungsexperimenten mit dem Konstrukt FHOD1 (1-339) und einer GTPase bisher keine Bindung beobachtet werden konnte. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein anderer Bindungspartner fehlt, der diese Oberfläche komplementieren könnte und so die zur Interaktion notwendige Flexibilität induziert. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen stellte sich in Expressionstudien heraus, dass ein Konstrukt der isolierten FH3 Domäne (116-339) unlöslich ist, was möglicherweise durch die

hydrophoben Reste des ersten Repeats verursacht wird. Die gleichen Tendenzen sind bei einem Konstrukt von (1-339) mit einer F29G Mutation zu beobachten.

Zudem ist denkbar, dass zur Bindung der spezifischen GTPase weitere Kofaktoren, wie die schon erwähnte FHOD-spezifische Region (1011-1096) oder andere, noch nicht identifizierte Proteine notwendig sind. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine FHOD1- Δ C Deletionsmutante (1-1010) nicht in der Lage ist, Rac1 oder eine andere Rho-GTPase zu binden (Gasteier et al., 2003; Gasteier et al., 2005). Möglicherweise erkennt die entsprechende GTPase, unabhängig davon ob die Bindungsstelle am N-Terminus oder zentral im Protein liegt, nur den autoinhibierten Zustand von FHOD1, welcher in den durchgeführten *in vitro* Bindungsexperimenten mit der singulären RBD oder dem Konstrukt RBD-FH3 nicht existiert. Im Kontext des Vollängenproteins könnten die entsprechenden FHOD1 Domänen eine andere Konformation einnehmen, die GTPasen Bindung ermöglicht. In der Komplexstruktur FH3/DAD in mDia1 ist analog dazu die Konformation der FH3 Domäne verändert im Vergleich zur Struktur mit der GTPase RhoA (Lammers et al., 2005; Rose et al. 2005). RhoA Bindung konnte hier nur durch Verdrängung des DAD Peptids nachgewiesen werden. In zukünftigen Bindungsexperimenten mit FHOD1 und der entsprechenden GTPase sollte also auch die Gegenwart der DAD (1104-1164) oder eines N-terminal verlängerten Fragments (1011-1164) berücksichtigt werden. Eine Klärung der FHOD1-GTPasen Interaktion könnte also einerseits durch Strukturdaten sowie andererseits in Experimenten mit Vollängenprotein untersucht werden. Um zu überprüfen, ob die Subdomäne zwischen der FH2 Domäne und der DAD auch in den Aktivierungsmechanismus involviert ist, sollten weitere Kristallisationsexperimente mit einer möglichen GTPase und der RBD, bzw. dem Konstrukt (1-339), in Gegenwart dieser Domäne durchgeführt werden. Zur Aufklärung des Bindungsmechanismus soll schließlich der Komplex aus RBD/GTPase im Triphosphat-gebundenen Zustand mit kristallographischen Methoden strukturell bestimmt werden. Möglicherweise können dabei Mutationen in die RBD eingeführt werden, analog zur Vorgehensweise in der Strukturbestimmung des PI3K-RBD/Ras Komplexes (Pacold et al., 2000), die die Bindung der RBD zur GTPase *in vitro* verstärken, um so ein für die Kristallisation geeignetes Template zu schaffen. Geeignete Reste ergeben sich dabei aus einem Vergleich zwischen der FHOD1-RBD und den Ras-Effektoren c-Raf1, RalGDS und Byr2 und beinhalten die Mutationen P41K, D46R, L61K sowie T109R. Es wurde schon gezeigt, dass im Konstrukt RBD-FH3 die F29G Mutation zu einem unlöslichen Protein führt, das nicht die erwartete Flexibilität der Schleife in der RBD erzeugte. Zusätzliche Mutationen der hydrophoben Reste auf der Oberfläche der endständigen Repeats der FH3 Domäne (116-339) wie V118A oder L336A können möglicherweise helfen dieses Konstrukt zu solubilisieren. Durch Mutationsstudien können darüber hinaus *in vitro* die „hot spots“ der Bindung charakterisiert werden. Parallel dazu können die an der Assoziation beteiligten Reste der FHOD1-RBD mit ^{15}N markiertem Protein in NMR-spektroskopischen Kartierungsexperimenten identifiziert werden.

Ausblick zur Analyse des Regulationsmechanismus in FHOD1

Die Existenz einer RBD als GTPase-bindende Domäne in FHOD1 scheint spezifisch für Formine zu sein. Von großem Interesse ist die Identifizierung der GTPase, die zur Aufklärung des auto-regulatorischen Mechanismus in FHOD1 und des Mechanismus der Aktivierung durch diese

GTPase dienen kann. Dazu soll zuerst ein *in vivo* Screening durchgeführt werden. Die zelluläre Lokalisation des Konstrukts FHOD1- Δ RBD (115-1164) könnte ebenso Einblicke in die Funktion der RBD geben. Diese Experimente finden derzeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Oliver Fackler an der Universität Heidelberg, Institut für Virologie, statt.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Autoinhibierung durch die DAD in FHOD1 ist die Strukturbestimmung der RBD-FH3 Domäne in Komplex mit der DAD oder der N-terminal verlängerten DAD von großem Interesse. Sequenzvergleiche anhand der gelösten Strukturen zeigten keine signifikante Homologie, so dass sich hieraus nicht unmittelbar die an der Bindung beteiligten Reste ableiten lassen. Möglicherweise kann dieser Komplex ebenfalls in Gegenwart der GTPase bestimmt werden. Durch weitere Komplexstrukturen würden konformationelle Änderungen zur freien RBD oder FH3 Domäne erkannt werden, die zur Klärung des Inhibierungs- und Aktivierungsmechanismus in FHOD1 dienen könnten.

Die hier als zweite Struktur der N-terminalen Domänen der Formine bestimmte humane FHOD1 Struktur zeigt Ähnlichkeiten (FH3) und Unterschiede (GBD) in der Domänenarchitektur von Diaphanous-verwandten Forminen. Einerseits kann die Architektur der konservierten FH3 Domäne auf andere Formine übertragen werden, und andererseits lässt die Existenz der einzigartigen RBD in FHOD1 auf einen spezifischen Aktivierungsmechanismus oder auf die Beteiligung in einem neuen Signaltransduktionsweg schließen und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Anhang

6.1 Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_d aus Gleichgewichts-Fluoreszenztitrationen

Die Gleichgewichtsreaktion der Bindung kann wie folgt beschrieben werden:



Die Dissoziationskonstante K_d ergibt sich aus dem Quotienten der dissoziierten und assoziierten Protein(P)/Liganden(L) Komplex:

$$K_d = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} \quad (2)$$

Die Dissoziationskonstante kann durch Angleichen der mittels Fluoreszenztitration erhaltenen Bindungskurve an eine quadratische Gleichung ermittelt werden.

Nach Massenerhaltung gilt:

$$[L]_0 = [L] + [PL] \quad \text{und} \quad [P]_0 = [P] + [PL] \quad (3)$$

$[P]_0$, $[L]_0$ = Gesamtkonzentration an Protein bzw. Ligand,

$[P]$, $[L]$ = Konzentration an freiem Protein bzw. Ligand,

$[PL]$ = Konzentration des Protein/Ligand Komplex.

Aus Massenwirkungsgesetz (2) und Massenerhaltung (3) gilt:

$$K_d = \frac{([P]_0 - [PL]) \cdot ([L]_0 - [PL])}{[PL]} \quad (4)$$

Auflösen der Gleichung nach $[PL]$ ergibt zwei Lösungen:

$$[PL] = \frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [L]_0} \quad (5)$$

Physikalisch sinnvoll ist hierbei nur die Lösung mit dem negativen Vorzeichen vor dem Wurzelterm. Bei der Fluoreszenztitration ist die Messgröße die Änderung der Fluoreszenzemission des fluoreszierenden Liganden. Die Änderung ist proportional zum Bindungsgrad, der durch das Verhältnis von $[PL]$ zu $[L]_0$ gegeben ist. Die Proportionalitätskonstante ist dabei die maximale Fluoreszenzänderung ΔF_{\max} , die unter Sättigungsbedingungen zu beobachten ist.

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \cdot \frac{[PL]}{[L]_0} \quad (6)$$

ΔF = partielle Fluoreszenzänderung des Titrationsschritts,

ΔF_{\max} = maximale Fluoreszenzänderung bei Sättigung.

Die gemessene Gesamtfluoreszenz F in jedem Titrationsschritt setzt sich zusammen aus der Grundfluoreszenz F_0 des freien fluoreszierenden Liganden und der Fluoreszenzänderung ΔF durch Zugabe des Proteins. Zusammen mit Gleichung 6 ergibt sich:

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{[PL]}{[L]_0} \quad (7)$$

Somit ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz durch Einsetzen von Gleichung 5 der folgende Zusammenhang zur Bestimmung von K_d :

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0} \quad (8)$$

F = Fluoreszenzintensität,

F_0 = Grundfluoreszenz des vorgelegten Liganden,

F_{\max} = maximale Fluoreszenzintensität bei Sättigung,

$[P]_0$ = Gesamtkonzentration des Proteins,

$[L]_0$ = Gesamtkonzentration des fluoreszierenden Liganden.

6.2 Analyse von Verdrängungsreaktionen mit Scientist

Der in dieser Arbeit durchgeführte Fluoreszenz-Kompetitions-Assay wurde mit Hilfe des Programms Scientist unter Anwendung folgenden Modells ausgewertet:

```
//second order reversible
IndVars: t
DepVars:A, B, C, D, E, F
Params: K1, K2, K3, K4, Ya, Yc
A'=-K1*A*B+K2*C
B'=-K1*A*B+K2*C-K3*B*D+K4*E
C'=K1*A*B-K2*C
D'=-K3*D*B+K4*E
E'=K3*D*B-K4*E
F=A*Ya+C*Yc
//Parameter values
K1=3.5
K2=12.41
K3=3.8
K4=10
Ya=0.2951
Yc=0.6328
//Initial conditions
t=0.000
A=1.5
B=1.5
C=1.0
D=50
E=0
```

Die Gleichungsdatei enthält die Differentialgleichungen für die zeitliche Änderung der unterschiedlichen Species (A = TBD-EDANS (wt), B = CycT1, C = Komplex CycT1/TBD-EDANS (wt), D = TBD-Mutante, E = Komplex CycT1/TBD (Mutante)). Die Änderung der Fluoreszenzintensität wird abhängig von der signalgebenden Species in einer Gleichung beschrieben. Die Anfangsbedingungen, wie die Konzentrationen und Anfangsfluoreszenz, sowie Schätzwerte für die zu berechnenden Ratenkonstanten sind gegeben. Die Auswertung der Messergebnisse wurde mit den bekannten Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der Bindung für wildtyp Hexim1 ($K1 = 3.5 \text{ s}^{-1}\mu\text{m}^{-1}$ und $K2 = 12.41 \text{ s}^{-1}$) durchgeführt, wobei K3 und K4 jeweils die zu ermittelnden Raten der Bindung der TBD-Mutanten an CycT1 darstellen (siehe zugehöriges Schema im Ergebnisteil).

7 Literaturverzeichnis

- Adelman,K., Marr,M.T., Werner,J., Saunders,A., Ni,Z.Y., Andrulis,E.D., and Lis,J.T., 2005. Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIS. *Molecular Cell*, 17:103-112 pp.
- Alberts,A.S., 2001. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 276:2824-2830 pp.
- 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 Journal*, 16:958-967 pp.
- Andrade,M.A., Petosa,C., O'Donoghue,S.I., Muller,C.W., and Bork,P., 2001. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *Journal of Molecular Biology*, 309:1-18 pp.
- Barboric,M., Nissen,R.M., Kanazawa,S., Jabrane-Ferrat,N., and Peterlin,B.M., 2001. NF-kappa B binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular Cell*, 8:327-337 pp.
- Barboric,M. and Peterlin,B.M., 2005. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV tat and the control of transcriptional elongation. *Plos Biology*, 3:200-203 pp.
- Berryman,M., Franck,Z., and Bretscher,A., 1993. Ezrin Is Concentrated in the Apical Microvilli of A Wide Variety of Epithelial-Cells Whereas Moesin Is Found Primarily in Endothelial-Cells. *Journal of Cell Science*, 105:1025-1043 pp.
- Blazek,D., Barboric,M., Kohoutek,J., Oven,I., and Peterlin,B.M., 2005. Oligomerization of HEXIM1 via 7SK snRNA and coiled-coil region directs the inhibition of P-TEFb. *Nucleic Acids Res.*, 33:7000-7010 pp.
- Boehm,A.K., Saunders,A., Werner,J., and Lis,J.T., 2003. Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Molecular and Cellular Biology*, 23:7628-7637 pp.
- Boehm,M.B., Milius,T.J., Zhou,Y., Westendorf,J.J., and Koka,S., 2005. The mammalian formin FHOD1 interacts with the ERK MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 335:1090-1094 pp.
- Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F., 1990. The Gtpase Superfamily - A Conserved Switch for Diverse Cell Functions. *Nature*, 348:125-132 pp.
- Brotherton,D.H., Dhanaraj,V., Wick,S., Brizuela,L., Domaille,P.J., Volyanik,E., Xu,X., Parisini,E., Smith,B.O., Archer,S.J., Serrano,M., Brenner,S.L., Blundell,T.L., and Laue,E.D., 1998. Crystal structure of the complex of the cyclin D dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19(INK4d). *Nature*, 395:244-250 pp.
- Brown,N.R., Noble,M.E.M., Endicott,J.A., and Johnson,L.N., 1999. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology*, 1:438-443 pp.
- Brunger,A.T., Adams,P.D., Clore,G.M., Delano,W.L., Gros,P., Grosse-Kunstleve,R.W., Jiang,J.S., Kuszewski,J., Nilges,M., Pannu,N.S., Read,R.J., Rice,L.M., Simonson,T., and Warren,G.L., 1998. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 54:905-921 pp.
- Bushnell,D.A., Westover,K.D., Davis,R.E., and Kornberg,R.D., 2004. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II-TFIIB cocystal at 4.5 angstroms. *Science*, 303:983-988 pp.
- Byers,S.A., Price,J.P., Cooper,J.J., Li,Q., and Price,D.H., 2005. HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *J. Biol. Chem.*, 280:16360-16367 pp.
- Castrillon,D.H. and Wasserman,S.A., 1994. Diaphanous Is Required for Cytokinesis in Drosophila and Shares Domains of Similarity with the Products of the Limb Deformity Gene. *Development*, 120:3367-3377 pp.
- Chang,F., Drubin,D., and Nurse,P., 1997. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *Journal of Cell Biology*, 137:169-182 pp.
- Chao,S.H. and Price,D.H., 2001. Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 276:31793-31799 pp.
- 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 pp.

- Cheng, K.Y., Noble, M.E.M., Skamnaki, V., Brown, N.R., Lowe, E.D., Kontogiannis, L., Shen, K., Cole, P.A., Siligardi, G., and Johnson, L.N., 2006. The role of the phospho-CDK2/cyclin A recruitment site in substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 281:23167-23179 pp.
- Chodosh, L.A., Fire, A., Samuels, M., and Sharp, P.A., 1989. 5,6-Dichloro-1-Beta-D-Ribofuranosylbenzimidazole Inhibits Transcription Elongation by Rna Polymerase-ii In vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 264:2250-2257 pp.
- Coin, F. and Egly, J.M., 1998. Ten years of TFIIH. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 63:105-110 pp.
- Conaway, J.W. and Conaway, R.C., 1999. Transcription elongation and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 68:301-319 pp.
- Conti, E. and Izaurralde, E., 2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:310-319 pp.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J., 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, 94:193-204 pp.
- Cramer, P., 2004. RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14:218-226 pp.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D., 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, 292:1863-1876 pp.
- Cullen, B.R., 1994. Rna-Sequence-Mediated Gene-Regulation in Hiv-1. *Infectious Agents and Disease-Reviews Issues and Commentary*, 3:68-76 pp.
- Dahmus, M.E., 1995. Phosphorylation of the C-Terminal Domain of Rna-Polymerase-ii. *Biochimica et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression*, 1261:171-182 pp.
- Dames, S.A., Schonichen, A., Schulte, A., Barboric, M., Peterlin, B.M., Grzesiek, S., and Geyer, M., 2006. Structure of the Cyclin T-binding domain of Hexim1 and molecular basis for its recognition of P-TEFb, submitted. *EMBO J.*
- Dulac, C., Michels, A.A., Fraldi, A., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Napolitano, G., Lania, L., and Bensaude, O., 2005. Transcription-dependent association of multiple positive transcription elongation factor units to a HEXIM multimer. *J. Biol. Chem.*, 280:30619-30629 pp.
- Dvir, A., 2002. Promoter escape by RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression*, 1577:208-223 pp.
- 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 pp.
- Fu, T.J., Peng, J.M., Lee, G., Price, D.H., and Flores, O., 1999. Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 274:34527-34530 pp.
- Fujinaga, K., Cujec, T.P., Peng, J.M., Garriga, J., Price, D.H., Grana, X., and Peterlin, B.M., 1998. The ability of positive transcription elongation factor b to transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat. *Journal of Virology*, 72:7154-7159 pp.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y.H., 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. *Molecular and Cellular Biology*, 24:787-795 pp.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Taube, R., Zhang, F., Geyer, M., and Peterlin, B.M., 2002. A minimal chimera of human cyclin T1 and Tat binds TAR and activates human immunodeficiency virus transcription in murine cells. *Journal of Virology*, 76:12934-12939 pp.
- Garber, M.E., Mayall, T.P., Suess, E.M., Meisenhelder, J., Thompson, N.E., and Jones, K.A., 2000. CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 Tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Molecular and Cellular Biology*, 20:6958-6969 pp.
- 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. *Genes & Development*, 12:3512-3527 pp.
- Garriga, J., Bhattacharya, S., Calbo, J., Marshall, R.M., Truongcao, M., Haines, D.S., and Grana, X., 2003. CDK9 is constitutively expressed throughout the cell cycle, and its steady-state expression is independent of SKP2. *Molecular and Cellular Biology*, 23:5165-5173 pp.
- Gasteier, J.E., Madrid, R., Krautkramer, E., Schroder, S., Muranyi, W., Benichou, S., and Fackler, O.T., 2003. Activation of the Rac-binding partner FHOD1 induces actin stress fibers via a ROCK-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278:38902-38912 pp.

- Gasteier, J.E., Schroeder, S., Muranyi, W., Madrid, R., Benichou, S., and Fackler, O.T., 2005. FHOD1 coordinates actin filament and microtubule alignment to mediate cell elongation. *Exp. Cell Res.*, 306:192-202 pp.
- Geyer, M., Schweins, T., Herrmann, C., Prisner, T., Wittinghofer, A., and Kalbitzer, H.R., 1996. Conformational transitions in p21(ras) and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP. *Biochemistry*, 35:10308-10320 pp.
- Geyer, M. and Wittinghofer, A., 1997. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 7:786-792 pp.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J.H., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D., 2001. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 angstrom resolution. *Science*, 292:1876-1882 pp.
- Goodrich, J.A. and Kugel, J.F., 2006. Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:612-616 pp.
- Goody, R.S., 2003. What to do if there is no signal: using competition experiments to determine binding parameters. In: K.A.Jones (Editor), *Kinetic Analysis of Macromolecules. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 153-170.
- Grana, X., Deluca, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:3834-3838 pp.
- Hahn, S., 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:394-403 pp.
- Han, B.G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., and Jap, B.K., 2000. Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nature Structural Biology*, 7:871-875 pp.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F., 1998. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6, control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 12:357-369 pp.
- Heineke, J. and Molkenin, J.D., 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:589-600 pp.
- Herrmann, C., 2003. Ras-effector interactions: after one decade. *Current Opinion in Structural Biology*, 13:122-129 pp.
- Herrmann, C. and Nassar, N., 1996. Ras and its effectors. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 66:1-41 pp.
- Hieb, A.R., Baran, S., Goodrich, J.A., and Kugel, J.F., 2006. An 8 nt RNA triggers a rate-limiting shift of RNA polymerase II complexes into elongation. *Embo Journal*, 25:3100-3109 pp.
- Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegueda, Y., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N., 2004. Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science*, 303:2007-2010 pp.
- Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P., 2005. Structure of the mediator subunit cyclin C and its implications for CDK8 function. *Journal of Molecular Biology*, 350:833-842 pp.
- Holmes, K.C., Goody, R.S., and Amos, L.A., 1982. The Structure of S1-Decorated Actin-Filaments Calculated from X-Ray-Diffraction Data with Phases Derived from Electron-Micrographs. *Ultramicroscopy*, 9:37-& pp.
- Holstege, F.C.P. and Timmers, H.T.M., 1997. Analysis of open complex formation during RNA polymerase II transcription initiation using heteroduplex templates and potassium permanganate probing. *Methods-A Companion to Methods in Enzymology*, 12:203-211 pp.
- 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 Journal*, 24:452-463 pp.
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G.S., and Kim, S.H., 1998. Structural basis for the interaction of Ras with RaIGDS. *Nature Structural Biology*, 5:422-426 pp.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I., 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*, 90:871-882 pp.
- Isel, C. and Karn, J., 1999. Direct evidence that MIV-1 tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *Journal of Molecular Biology*, 290:929-941 pp.
- ISHIKAWA, H., Bischoff, R., and Holtzer, H., 1969. Formation of Arrowhead Complexes with Heavy Meromyosin in A Variety of Cell Types. *Journal of Cell Biology*, 43:312-& pp.
- Ivanov, D., Kwak, Y.T., Guo, J., and Gaynor, R.B., 2000. Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties. *Molecular and Cellular Biology*, 20:2970-2983 pp.

- Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M.S., 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. *Molecular Cell*, 19:523-534 pp.
- Jeffrey, P.D., Ruso, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P., 1995. Mechanism of Cdk Activation Revealed by the Structure of A Cyclin-Cdk2 Complex. *Nature*, 376:313-320 pp.
- Jones, K.A. and Peterlin, B.M., 1994. Control of Rna Initiation and Elongation at the Hiv-1 Promoter. *Annual Review of Biochemistry*, 63:717-743 pp.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M., 1991. Improved Methods for Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A*, 47:110-119 pp.
- Kabsch, W., 1993. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography*, 26:795-800 pp.
- Kadonaga, J.T., 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell*, 116:247-257 pp.
- Kanazawa, S., Okamoto, T., and Peterlin, B.M., 2000. Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity*, 12:61-70 pp.
- Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T., and Peterlin, B.M., 2003. c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene*, 22:5707-5711 pp.
- Karn, J., 1999. Tackling Tat. *Journal of Molecular Biology*, 293:235-254 pp.
- Kiel, C. and Serrano, L., 2006. The ubiquitin domain superfold: Structure-based sequence alignments and characterization of binding epitopes. *Journal of Molecular Biology*, 355:821-844 pp.
- Kiel, C., Wohlgemuth, S., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-Borg, J., Wittinghofer, F., and Serrano, L., 2005. Recognizing and defining true Ras binding domains II: In silico prediction based on homology modelling and energy calculations. *Journal of Molecular Biology*, 348:759-775 pp.
- Kiernan, R.E., Emiliani, S., Nakayama, E., Castro, A., Labbe, J.C., Lorca, T., Nakayama, K., and Benkirane, A., 2001. Interaction between cyclin T1 and SCFSKP2 targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome. *Molecular and Cellular Biology*, 21:7956-7970 pp.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 276:12317-12323 pp.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C.X., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y.N., Green, R.D., and Ren, B., 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature*, 436:876-880 pp.
- Kleywegt, G.J. and Jones, T.A., 1994. Detection, Delineation, Measurement and Display of Cavities in Macromolecular Structures. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 50:178-185 pp.
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L., 2002. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23:417-425 pp.
- Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L., and Pollard, T.D., 2003. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *Journal of Cell Biology*, 161:875-887 pp.
- Kovar, D.R. and Pollard, T.D., 2004. Progressing actin: sFormin as a processive elongation machine. *Nature Cell Biology*, 6:1158-1159 pp.
- Krissinel, E. and Henrick, K., 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 60:2256-2268 pp.
- Kurosu, T. and Peterlin, B.M., 2004. VP16 and ubiquitin: Binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes. *Current Biology*, 14:1112-1116 pp.
- Kurosu, T., Zhang, F., and Peterlin, B.M., 2004. Transcriptional activity and substrate recognition of cyclin T2 from P-TEFb. *Gene*, 343:173-179 pp.
- Kusuhara, M., Nagasaki, K., Kimura, K., Maass, N., Manabe, T., Ishikawa, S., Aikawa, M., Miyazaki, K., and Yamaguchi, K., 1999. Cloning of hexamethylene-bis-acetamide-inducible transcript, HEXIM1, in human vascular smooth muscle cells. *Biomed. Res.*, 20:273-279 pp.
- Lacy, E.R., Filippov, I., Lewis, W.S., Otieno, S., Xiao, L.M., Weiss, S., Hengst, L., and Kriwacki, R.W., 2004. p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:358-364 pp.
- Lammers, M., Rose, R., Scrima, A., and Wittinghofer, A., 2005. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho center dot GTP. *Embo Journal*, 24:4176-4187 pp.
- Laskowski, R.A., Macarthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M., 1993. Procheck - A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26:283-291 pp.

- Lee,D.K., Duan,H.O., and Chang,C.S., 2001. Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 276:9978-9984 pp.
- Li,F. and Higgs,H.N., 2005. Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *Journal of Biological Chemistry*, 280:6986-6992 pp.
- 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 pp.
- Liao,S.M., Zhang,J.H., Jeffrey,D.A., Koleske,A.J., Thompson,C.M., Chao,D.M., Viljoen,M., Vanvuuren,H.J.J., and Young,R.A., 1995. A Kinase-Cyclin Pair in the Rna-Polymerase-Ii Holoenzyme. *Nature*, 374:193-196 pp.
- Lin,X., Taube,R., Fujinaga,K., and Peterlin,B.M., 2002. P-TEFb containing cyclin K and Cdk9 can activate transcription via RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 277:16873-16878 pp.
- Lis,J.T., Mason,P., Peng,J., Price,D.H., and Werner,J., 2000. P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes & Development*, 14:792-803 pp.
- Lolli,G., Lowe,E.D., Brown,N.R., and Johnson,L.N., 2004. The crystal structure of human CDK7 and its protein recognition properties. *Structure*, 12:2067-2079 pp.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:7572-7577 pp.
- Marshall,N.F., Peng,J.M., Xie,Z., and Price,D.H., 1996. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271:27176-27183 pp.
- Marshall,N.F. and Price,D.H., 1995. Purification of P-Tefb, A Transcription Factor Required for the Transition Into Productive Elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 270:12335-12338 pp.
- Matsumoto,K., Asano,T., and Endo,T., 1997. Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton. *Oncogene*, 15:2409-2417 pp.
- Meinhart,A., Kamenski,T., Hoepfner,S., Baumli,S., and Cramer,P., 2005. A structural perspective of CTD function. *Genes & Development*, 19:1401-1415 pp.
- 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., and Bensaude,O., 2004. Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J.*, 23:2608-2619 pp.
- 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 pp.
- Morgan,D.O., 1995. Principles of Cdk Regulation. *Nature*, 374:131-134 pp.
- Muller,M.M., Gerster,T., and Schaffner,W., 1988. Enhancer Sequences and the Regulation of Gene-Transcription. *European Journal of Biochemistry*, 176:485-495 pp.
- Naar,A.M., Lemon,B.D., and Tjian,R., 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 70:475-501 pp.
- Nabel,G. and Baltimore,D., 1987. An Inducible Transcription Factor Activates Expression of Human-Immunodeficiency-Virus in T-Cells. *Nature*, 326:711-713 pp.
- Nagai,K. and Mattaj,I.W., 1995. RNA-Protein Interactions. Oxford University Press, Oxford.
- Napolitano,G., Licciardo,P., Gallo,P., Majello,B., Giordano,A., and Lania,L., 1999. The CDK9-associated cyclins T1 and T2 exert opposite effects on HIV-1 Tat activity. *Aids*, 13:1453-1459 pp.
- Narlikar,G.J., Fan,H.Y., and Kingston,R.E., 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108:475-487 pp.
- Nassar,M., Horn,G., Herrmann,C., Scherer,A., McCormick,F., and Wittinghofer,A., 1995. The 2.2-Angstrom Crystal-Structure of the Ras-Binding Domain of the Serine Threonine Kinase C-Raf1 in Complex with Rap1A and A Gtp Analog. *Nature*, 375:554-560 pp.
- Nezami,A.G., Poy,F., and Eck,M.J., 2006. Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. *Structure*, 14:257-263 pp.
- Nguyen,V.T., Kiss,T.S., 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 pp.
- Nicholls,A., Bharadwaj,R., and Honig,B., 1993. Grasp - Graphical Representation and Analysis of Surface-Properties. *Biophysical Journal*, 64:A166 pp.
- Noble,M.E.M., Endicott,J.A., Brown,N.R., and Johnson,L.N., 1997. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends in Biochemical Sciences*, 22:482-487 pp.

- Noble, M.E.M., Endicott, J.A., and Johnson, L.N., 2004. Protein kinase inhibitors: Insights into drug design from structure. *Science*, 303:1800-1805 pp.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K., 2005. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*, 433:488-494 pp.
- Ouchida, R., Kusahara, 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 pp.
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., and Williams, R.L., 2000. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell*, 103:931-943 pp.
- Pal, M. and Luse, D.S., 2003. The initiation-elongation transition: Lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:5700-5705 pp.
- 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. *Molecular Cell*, 19:101-110 pp.
- Palangat, M., Renner, D.B., Price, D.H., and Landick, R., 2005. A negative elongation factor for human RNA polymerase II inhibits the anti-arrest transcript-cleavage factor TFIIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:15036-15041 pp.
- Pavletich, N.P., 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: Structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 287:821-828 pp.
- Pei, Y., Schwer, B., and Shuman, S., 2003. Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control. *Journal of Biological Chemistry*, 278:7180-7188 pp.
- Peng, J., Wallar, B.J., Flanders, A., Swiatek, P.J., and Alberts, A.S., 2003. Disruption of the diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Current Biology*, 13:534-545 pp.
- Peng, J.M., Zhu, Y.R., Milton, J.T., and Price, D.H., 1998. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes & Development*, 12:755-762 pp.
- Peterlin, B.M. and Price, D.H., 2006. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular Cell*, 23:297-305 pp.
- Pines, J., 1994. The Cell-Cycle Kinases. *Seminars in Cancer Biology*, 5:305-313 pp.
- Ping, Y.H. and Rana, T.M., 2001. DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 276:12951-12958 pp.
- Prelich, G., 2002. RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: Emerging clues to their function. *Eukaryotic Cell*, 1:153-162 pp.
- Price, D.H., 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 20:2629-2634 pp.
- Proudfoot, N.J., Furger, A., and Dye, M.J., 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 108:501-512 pp.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P.I.H., 2005. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*, 307:1746-1752 pp.
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A., 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature*, 435:513-518 pp.
- Rougvie, A.E. and Lis, J.T., 1988. The Rna Polymerase-ii Molecule at the 5' End of the Uninduced Hsp70 Gene of *Drosophila-Melanogaster* Is Transcriptionally Engaged. *Cell*, 54:795-804 pp.
- Rougvie, A.E. and Lis, J.T., 1990. Postinitiation Transcriptional Control in *Drosophila-Melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 10:6041-6045 pp.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., and Pavletich, N.P., 1996. Crystal structure of the p27(Kip1) cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A Cdk2 complex. *Nature*, 382:325-331 pp.
- Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.O., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P., 1998. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16(INK4a). *Nature*, 395:237-243 pp.
- 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. *Nature Medicine*, 8:1310-1317 pp.

- Saunders,A., Core,L.J., and Lis,J.T., 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:557-567 pp.
- Scheffzek,K., Grunewald,P., Wohlgemuth,S., Kabsch,W., Tu,H., Wigler,M., Wittinghofer,A., and Herrmann,C., 2001. The Ras-Byr2RBD complex: Structural basis for Ras effector recognition in yeast. *Structure*, 9:1043-1050 pp.
- Schonichen,A., Alexander,M., Gasteier,J.E., Cuesta,F.E., Fackler,O.T., and Geyer,M., 2006. Biochemical characterization of the diaphanous autoregulatory interaction in the formin homology protein FHOD1. *J. Biol. Chem.*, 281:5084-5093 pp.
- 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 pp.
- Sehgal,P.B., Darnell,J.E., and Tamm,I., 1976. Inhibition by Drb (5,6-Dichloro-1-Beta-D-Ribofuranosylbenzimidazole) of Hnrna and Messenger-Rna Production in Hela-Cells. *Cell*, 9:473-480 pp.
- Selby,M.J. and Peterlin,B.M., 1990. Transactivation by Hiv-1 Tat Via A Heterologous Rna-Binding Protein. *Cell*, 62:769-776 pp.
- Serebriiskii,I., Estojak,J., Sonoda,G., Testa,J.R., and Golemis,E.A., 1997. Association of Krev-1/rapla with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene*, 15:1043-1049 pp.
- Sherr,C.J. and Roberts,J.M., 1995. Inhibitors of Mammalian G(1) Cyclin-Dependent Kinases. *Genes & Development*, 9:1149-1163 pp.
- Sherr,C.J. and Roberts,J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G(1)-phase progression. *Genes & Development*, 13:1501-1512 pp.
- Shimada,A., Nyitrai,M., Vetter,I.R., Kuhlmann,D., Bugyi,B., Narumiya,S., Geeves,M.A., and Wittinghofer,A., 2004. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular Cell*, 13:511-522 pp.
- Shore,S.M., Byers,S.A., Maury,W., and Price,D.H., 2003. Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene*, 307:175-182 pp.
- Simone,C., Stiegler,P., Bagella,L., Pucci,B., Bellan,C., De Falco,G., De Luca,A., Guanti,G., Puri,P.L., and Giordano,A., 2002. Activation of MyoD-dependent transcription by cdk9/cyclin T2. *Oncogene*, 21:4137-4148 pp.
- Sims,R.J., Mandal,S.S., and Reinberg,D., 2004. Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 16:263-271 pp.
- Smale,S.T. and Kadonaga,J.T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry*, 72:449-479 pp.
- Spoerner,M., Herrmann,C., Vetter,I.R., Kalbitzer,H.R., and Wittinghofer,A., 2001. Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:4944-4949 pp.
- Tao,J.S. and Frankel,A.D., 1992. Specific Binding of Arginine to Tar Rna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:2723-2726 pp.
- Taube,R., Fujinaga,K., Wimmer,J., Barboric,M., and Peterlin,B.M., 1999. Tat transactivation: A model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology*, 264:245-253 pp.
- Taube,R., Lin,X., Irwin,D., Fujinaga,K., and Peterlin,B.M., 2002. Interaction between P-TEFb and the C-terminal domain of RNA polymerase II activates transcriptional elongation from sites upstream or downstream of target genes. *Molecular and Cellular Biology*, 22:321-331 pp.
- Tompa,P., 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27:527-533 pp.
- Tsukita,S. and Yonemura,S., 1999. Cortical actin organization: Lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274:34507-34510 pp.
- Vavylonis,D., Kovar,D.R., O'Shaughnessy,B., and Pollard,T.D., 2006. Model of formin-associated actin filament elongation. *Molecular Cell*, 21:455-466 pp.
- Vetter,I.R. and Wittinghofer,A., 2001. Signal transduction - The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294:1299-1304 pp.
- Wada,T., Takagi,T., Yamaguchi,Y., Ferdous,A., Imai,T., Hirose,S., Sugimoto,S., Yano,K., Hartzog,G.A., Winston,F., Buratowski,S., and Handa,H., 1998. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & Development*, 12:343-356 pp.
- Walker,E.H., Perisic,O., Ried,C., Stephens,L., and Williams,R.L., 1999. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*, 402:313-320 pp.
- Waller,B.J. and Alberts,A.S., 2003. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 13:435-446 pp.

- Wasserman, S., 1998. FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends in Cell Biology*, 8:111-115 pp.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., and Narumiya, S., 1997. p140^{mDia}, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo Journal*, 16:3044-3056 pp.
- 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 pp.
- Westendorf, J.J., 2001. The formin/diaphanous-related protein, FHOS, interacts with Rac1 and activates transcription from the serum response element. *J. Biol. Chem.*, 276:46453-46459 pp.
- Westover, K.D., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D., 2004. Structural basis of transcription: Separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science*, 303:1014-1016 pp.
- Wittinghofer, A. and Nassar, N., 1996. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends in Biochemical Sciences*, 21:488-491 pp.
- 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 pp.
- Wohlgemuth, S., Kiel, C., Kramer, A., Serrano, L., Wittinghofer, F., and Herrmann, C., 2005. Recognizing and defining true Ras binding domains 1: Biochemical analysis. *Journal of Molecular Biology*, 348:741-758 pp.
- Xu, Y.W., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., and Eck, M.J., 2004. Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*, 116:711-723 pp.
- 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. *Molecular Cell*, 21:227-237 pp.
- Yang, X.Z., Gold, M.O., Tang, D.N., Lewis, D.E., AguilarCordova, E., Rice, A.P., and Herrmann, C.H., 1997. TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:12331-12336 pp.
- 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 pp.
- Yang, Z.Y., Zhu, Q.W., Luo, K.X., and Zhou, Q., 2001. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*, 414:317-322 pp.
- Ye, M., Shima, F., Muraoka, S., Liao, J.L., Okamoto, H., Yamamoto, M., Tamura, A., Yagi, N., Ueki, T., and Kataoka, T., 2005. Crystal structure of M-Ras reveals a GTP-bound "off" state conformation of Ras family small GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, 280:31267-31275 pp.
- 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 pp.
- 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 pp.
- Yik, J.H., Chen, R., Pezda, A.C., and Zhou, Q., 2005. Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive positive transcription elongation factor b complexes for control of transcription. *J. Biol. Chem.*, 280:16368-16376 pp.
- Zhang, F., Barboric, M., Blackwell, T.K., and Peterlin, B.M., 2003. A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb. *Genes & Development*, 17:748-758 pp.
- Zhang, J., Tamilarasu, N., Hwang, S.W., Garber, M.E., Huq, I., Jones, K.A., and Rana, T.M., 2000. HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *Journal of Biological Chemistry*, 275:34314-34319 pp.
- Zhu, Y.R., Peery, T., Peng, T.M., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B., and Price, D.H., 1997. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro. *Genes & Development*, 11:2622-2632 pp.

Danksagung

Mein Dank gilt...

Dr. Matthias Geyer für seine engagierte Betreuung, Diskussionsbereitschaft und Motivation & die intensive Wissensvermittlung über Strukturbiologie,

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

Prof. Dr. Roger S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung, die Einführung in die Kinetik & die Bereitstellung der hervorragenden Ausstattung der Abteilung,

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

Dr. Alexey Rak & Dr. Lena Pylypenko für die fachliche Unterstützung in der Röntgenkristallographie,

Dr. Kanchan Anand (EMBL Heidelberg), Dr. Matjaz Barboric (University of California, San Francisco) & Dr. Sonja Dames (Universität Basel) für freundschaftliche und fruchtbare Kooperationen,

ganz besonders meiner Arbeitsgruppe André, Diana, Friederike, Holger, Karin, Nadine, Santiago und Sebastian, ebenso Aymelt, Janina, Sabine, Tim, Uyen und Vanessa für Ihre Hilfsbereitschaft & Freundschaft.