

Biochemische Untersuchungen zur Regulation der
Transkriptionselongation durch Hexim und 7SK snRNA

Dissertation

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

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von

Dipl. Biochemikerin Nadine Czudnochowski

aus Duisburg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2005 bis Juli 2009 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von PD Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das humane Kinom	3
2.2	Strukturelle Eigenschaften eukaryotischer Proteinkinasen	5
2.3	Die Familie der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen	6
2.4	Regulation Cyclin-abhängiger Proteinkinasen	8
2.4.1	Cyclin Bindung und Phosphorylierung	8
2.4.2	Inhibition durch Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren	10
2.5	Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb)	11
2.6	Die Transkription in Eukaryoten	13
2.6.1	Die Carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II	15
2.6.2	Der Transkriptionszyklus	17
2.6.3	Transkriptionsarrest und Wirkung von P-TEFb	18
2.6.4	Kopplung von Transkription und mRNA Prozessierung	19
2.6.5	HIV-1 Transkriptionselongation	20
2.7	Regulation von P-TEFb	22
2.7.1	Die 7SK snRNA	23
2.7.2	Hexim als Inhibitor der Kinaseaktivität von P-TEFb	24
2.8	Zielsetzung	27
3	Material und Methoden	29
3.1	Materialien	29
3.1.1	Chemikalien	29
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3	Chromatographiematerialien	29
3.1.4	Nukleotide	29
3.1.5	Reagenziensätze	29
3.1.6	DNA-Konstrukte	30
3.1.7	Enzyme und Proteine	30
3.1.8	Bakterienstämme und Zelllinien	30
3.1.9	Laborgeräte	31
3.1.10	Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1	Polymerasekettenreaktion	32
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	33
3.2.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
3.2.4	Restriktionsverdau	33
3.2.5	Ligation	34
3.2.6	Transformation von Bakterien	34
3.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA	34
3.2.8	DNA-Sequenzierung	35
3.2.9	Glycerindauerkulturen	35
3.3	Proteinbiochemische Methoden	35
3.3.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	35
3.3.2	Zellaufschluss	36
3.3.3	Affinitätschromatographie	36
3.3.4	Präparative Größenausschlusschromatographie	37
3.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.3.6	Elektrophoretischer Mobilitätsverschiebungstest (EMSA)	38
3.3.7	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese	39

3.3.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
3.3.9	Konzentrierung von Proteinen	40
3.3.10	Reinigung des Positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P-TEFb)	40
3.3.11	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit 1,5-IAEDANS	40
3.3.12	GST-pull-down-Experimente	41
3.3.13	Filterbindungsassay	41
3.3.14	Analytische Größenausschlusschromatographie	42
3.3.15	Isopropanolfällung von Nukleinsäuren	42
3.3.16	Acetonfällung von Proteinen	42
3.3.17	Massenspektrometrie	43
3.4	Biophysikalische Methoden	43
3.4.1	NMR-Spektroskopie	43
3.4.2	Expression von uniform ¹⁵ N-markierten Proteinen	44
3.4.3	Isotherme Titrationskalorimetrie	44
3.4.4	CD-Spektroskopie	45
3.4.5	Stopped Flow-Messungen	45
3.5	Zellbiologische Methoden	46
3.5.1	Transformation von DH10Bac-Zellen	46
3.5.2	Isolation rekombinanter Bacmid-DNA	46
3.5.3	Kultivierung von Sf21 Zellen	46
3.5.4	Transfektion von Sf21 Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA	47
3.5.5	Virusamplifikation	47
3.5.6	Proteinexpression in Sf21 Zellen	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Die wechselseitige Hexim-Cyclin Interaktion	49
4.1.1	Identifizierung der Cyclin-bindenden Domäne in Hexim2	49
4.1.2	Darstellung der Hexim2 Proteinkonstrukte	51
4.1.3	Darstellung weiterer Proteine für die Interaktionsanalysen	52
4.1.4	Interaktion der C-terminalen Hexim2 Proteine und Cyclin T1	53
4.1.5	Bindungsspezifität zwischen Hexim1 und Hexim2 zu Cyclin T1/T2	53
4.1.6	Molekulare Dispersion des Hexim2-Cyclin T1 Komplexes	55
4.1.7	Bindung von Hexim1/2 an den nukleären Importfaktor Importin α	56
4.2	Die Interaktion von Hexim mit der 7SK RNA	59
4.2.1	Bindung von Hexim1-Cyclin T1 an die 7SK RNA	59
4.2.2	Bindung der Hexim-Homologe an die 5'-Schleife der 7SK RNA	61
4.2.3	Charakterisierung der Hexim1-7SK RNA Komplexformierung	63
4.2.4	Darstellung von RNA freiem Hexim1 und Interaktion mit der 7SK RNA	65
4.3	Untersuchung der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1	67
4.3.1	Darstellung des positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P-TEFb)	67
4.3.2	Darstellung von RNA-Polymerase II CTD Konstrukten	70
4.3.3	Phosphorylierung der CTD-Proteine durch P-TEFb	71
4.3.4	Untersuchung der Kinaseaktivität von P-TEFb	73
4.3.5	Inhibition von P-TEFb durch Hexim1	74
4.3.6	Bindungsaffinität zwischen Hexim1 194-359 und P-TEFb	77
4.3.7	Untersuchung der Kinetik der Hexim1-P-TEFb Interaktion	79
4.3.8	Einfluss des PYNT-Motivs von Hexim1 auf die Bindung an Cyclin T1	81
4.3.9	Formierung eines minimalen, inhibierten P-TEFb Komplexes	82
4.3.10	Kompetition von HIV-1 Tat und Hexim1 um die Bindung an Cyclin T1	83
4.4	Strukturelle Analyse des zentralen Bereichs von Cyclin T1	84
4.4.1	Darstellung der Cyclin T1 Proteine	84
4.4.2	CD- und NMR-Spektroskopie der Cyclin T1 Proteine	85
4.4.3	Interaktionsstudien zwischen RNA-Pol II CTD und Cyclin T1 sowie P-TEFb	87

5	Diskussion	89
5.1	Interaktionsstudien zwischen den Hexim-Homologen und Cyclin T1/T2, der 7SK RNA sowie Importin α	89
5.2	Mechanistische Studien zur Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 durch Hexim1	93
5.3	Phosphorylierung der CTD durch P-TEFb	97
6	Anhang	101
6.1	Herleitung der Formel für die Auswertung der ITC-Experimente.....	101
6.2	Isotherme Titrationskalorimetrie zwischen P-TEFb und Hexim1 194-359 T205G	102
6.3	Molekulargewichte der dargestellten Proteine	103
6.4	Fluoreszenz-Kompetitionsexperiment-Eingabeskript.....	104
7	Abkürzungsverzeichnis	105
8	Literaturverzeichnis	107

1 Zusammenfassung

Unmittelbar nach der Initiation der Transkription kommt es bei einer Vielzahl eukaryotischer Gene zu einem Arrest der RNA-Polymerase II (Pol II), der durch die negativen Transkriptionsfaktoren DSIF und NELF hervorgerufen wird. Der Übergang in die produktive Elongationsphase erfordert die Wirkung des positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P-TEFb), der die Carboxy-terminale-Domäne der RNA-Pol II (RNA-Pol II CTD) sowie die negativen Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. P-TEFb besteht aus der Kinase Cdk9 und einem C-Typ Cyclin (T1, T2 oder K) und wird seinerseits durch die Hexim-Homologe Hexim1 und Hexim2 sowie die kleine nukleäre 7SK RNA auf bisher ungeklärte Weise inhibiert. In seiner aktiven Form ist P-TEFb mit Brd4 assoziiert, das den Komplex an acetylierte Histone der Chromatinstrukturen und den Mediator-Komplex der RNA-Polymerase II koppelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Spezifität der Komplexbildung zwischen den beiden Hexim-Homologen mit den Cyclinen T1/T2 und der 7SK RNA untersucht. Dabei wurde zunächst die Cyclin T-bindende Domäne (TBD) von Hexim2 identifiziert, die im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist und die Reste 184 bis 286 umfasst. Die Bindung von Hexim1 und Hexim2 an Cyclin T1/T2 wurde anschließend mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Die höchsten Affinitäten konnten für die wechselseitige Hexim1-Cyclin T1 und Hexim2-Cyclin T2 Interaktion beobachtet werden, die Dissoziationskonstanten betragen in beiden Fällen $2,5 \mu\text{M}$. Eine jeweils vierfach schwächere Affinität wurde hingegen für die Bindung von Hexim1 an Cyclin T2 und von Hexim2 an Cyclin T1 festgestellt. Elektrophoretische Mobilitätsverschiebungs-Analysen mit radioaktiv markierter 7SK RNA wurden schließlich für die Bindungsstudien mit den Hexim-Homologen sowie dem Hexim1-Cyclin T1 Komplex eingesetzt. Eine Beteiligung von Cyclin T1 an der Bindung der 7SK RNA konnte dabei nicht beobachtet werden. Ferner wurde gezeigt, dass eine 66-mer Haarnadelschleife (nt 22-87) die Hexim-bindende Region darstellt. Die Dissoziationskonstante für den Hexim1-Cyclin T1 Komplex und für Hexim1 an diese Haarnadelschleife liegt um $0,3 \mu\text{M}$. Ähnliche Werte wurden ebenfalls für Hexim2 erhalten. Es wurden ebenfalls ITC-Messungen mit Hexim1/2 und dem nukleären Importfaktor Importin α durchgeführt, die K_d Werte von $2,0 \mu\text{M}$ für Hexim1 und $0,5 \mu\text{M}$ für Hexim2 ergaben. GST-*pull-down*-Analysen deuten die Formierung eines trimeren Komplexes aus Hexim-Cyclin T und Importin α an, der die nukleäre Lokalisation von Cyclin T1 vermitteln könnte.

Das zentrale Projekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 durch das Protein Hexim1. Für diese Untersuchungen wurde P-TEFb zunächst mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems dargestellt. Sowohl durch Coexpression beider Proteine in Sf21 Zellen als auch durch alleinige Expression von Cdk9 in Sf21 Zellen und Zugabe von rekombinanten Cyclin T1 aus *E.coli* während der Reinigung konnte ein stöchiometrischer, aktiver P-TEFb Komplex formiert werden. Das natürliche Substrat von P-TEFb stellt die RNA-Pol II CTD dar, die aus 52 Wiederholungen der Heptadsequenz

YSPTSPS aufgebaut ist. In dieser Arbeit wurden Proteine mit bis zu 13 Heptadwiederholungen dargestellt und in Phosphorylierungsstudien eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass diese CTD-Proteine von P-TEFb mehrfach phosphoryliert wurden und die Zahl der erhaltenen Phosphorylierungen der Anzahl an Heptadwiederholungen entsprach. Die Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von Hexim1 auf P-TEFb erfolgte mit Hilfe eines funktionalen Kinaseassays unter Verwendung von radioaktiv markiertem ATP und den CTD-Substraten. Dabei konnte Hexim1 200-359 als ein minimales, inhibierendes Protein identifiziert werden. Ein um die TBD C-terminal deletiertes Protein war hingegen nicht mehr zur Inhibition befähigt. In den folgenden Mutationsanalysen wurde beobachtet, dass Threonin205 des konservierten PYNT-Motivs essentiell für die inhibitorische Wirkung von Hexim1 ist. Schließlich wurde die Bindung von Hexim1 194-359 an P-TEFb mittels isothermer Titrationskalorimetrie untersucht. Es ergab sich eine Dissoziationskonstante von 0,3 μM . Die Affinität von Hexim1 zu Cyclin T1 sowie der Threonin-Mutante zu P-TEFb war hingegen um den Faktor sechs bzw. sieben schwächer. In zwei weiterführenden strukturellen Studien wurde zum einen der inaktive Komplex aus P-TEFb und Hexim1 194-359 dargestellt und zu Kristallisationszwecken eingesetzt. Hierbei wurden Kristalle erhalten, die jedoch nicht reproduziert werden konnten. Weiterhin wurde der zentrale Bereich des Cyclin T1 Proteins mittels CD- und NMR-Spektroskopie untersucht. Diese Studien ergaben, dass die dargestellten Proteine größtenteils unstrukturiert vorlagen. Mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Assays konnte schließlich gezeigt werden, dass das HIV-1 Tat Protein mit Hexim1 um die Bindung an Cyclin T1 kompetiert und dies im funktionalen Assay zu einem Wiedererlangen der inhibierten P-TEFb Kinaseaktivität führt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten auf einen dualen Binde- und Wirkmechanismus des Hexim1 Proteins zur Inhibition von P-TEFb hin. Sowohl die Bindung von Hexim1 auf Cyclin T1, die durch die TBD vermittelt wird, als auch das weiter N-terminale PYNT-Motiv sind für eine Inhibition von P-TEFb notwendig. Die Cyclin Untereinheit ist somit nicht nur für die Aktivierung des Cdks sondern auch für die spezifische Inhibition notwendig. Dies unterstreicht, dass der Heterokomplex Cdk9-Cyclin T1 eine funktionale Einheit bildet.

2 Einleitung

Die Phosphorylierung von Proteinen ist die am weitesten verbreitete posttranslationale Modifizierung in eukaryotischen Zellen. Schätzungen zufolge werden etwa 30% aller Proteine während ihres Daseins an mindestens einer Aminosäure phosphoryliert (Cohen, 2000; Pinna and Ruzzene, 1996). Kinasen sind die Enzyme, die den Transfer des endständigen γ -Phosphats von ATP auf einen Phosphatgruppenakzeptor katalysieren. In eukaryotischen Proteinen dienen die Hydroxylgruppen der Seitenketten von Serin, Threonin oder Tyrosin als vorwiegende Akzeptoren. Das Einbringen einer Phosphatgruppe an eine oder mehrere Aminosäuren eines Proteins kann Konformationsänderungen herbeiführen, die die Ausbildung neuer ionischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen, sowie Bindungsstellen blockieren oder neue Bindungsstellen für Proteininteraktionsdomänen schaffen, wie z.B. für SH2-Domänen (Seet et al., 2006). Durch Phosphatasen können diese Modifikationen wieder entfernt werden, weshalb die Phosphorylierung als reversible Modifikation bezeichnet wird. Das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen schafft in der Zelle ein zeitlich und räumlich begrenztes Signal, das die Aktivität von Proteinen ändern kann und hierdurch eine fundamentale Rolle in vielen zellulären Prozessen spielt. Dazu gehören u.a. die Transkription, die Zellzyklus-Progression, die Apoptose sowie die Differenzierung und Motilität von Zellen (Manning et al., 2002).

2.1 Das humane Kinom

Als erste Proteinkinase wurde in den 50er Jahren die Phosphorylase-Kinase von Edwin G. Krebs und Edmont H. Fischer gereinigt und charakterisiert (Krebs et al., 1959). Für ihre Forschung wurden Fischer und Krebs 1992 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt. Erst in den 80er Jahren stieg jedoch die Zahl der identifizierten Kinasen stark an, was nicht zuletzt der Entwicklung neuer Klonierungsstrategien zu verdanken war. Damals wurde prognostiziert, dass das humane Genom für mehr als 1000 Proteinkinasen codiere (Hunter, 1987). Nach der Sequenzierung des gesamten humanen Genoms ist bekannt, dass Proteinkinase-Gene mit einem Anteil von 1,7% aller humanen Gene die größte Genfamilie darstellen (Rubin et al., 2000). Die Gesamtheit aller Proteinkinasen, die auch als Kinom bezeichnet wird, umfasst 518 Kinase-Gene, denen eine weitaus größere Anzahl von Substraten gegenübersteht (Manning et al., 2002). Die meisten Kinasen gehören einer einzigen Superfamilie von Enzymen an, welche eine in Sequenz und Struktur konservierte Proteinkinasedomäne aufweist. Die Ähnlichkeit der Proteinsequenzen dieser katalytischen Kinasedomänen ist in dem folgenden Dendrogramm (Abbildung 1) dargestellt. Diese Domänenähnlichkeit bildet die Grundlage für die Klassifikation der Kinasen in neun Gruppen (Hanks and Hunter, 1995; Manning et al., 2002).

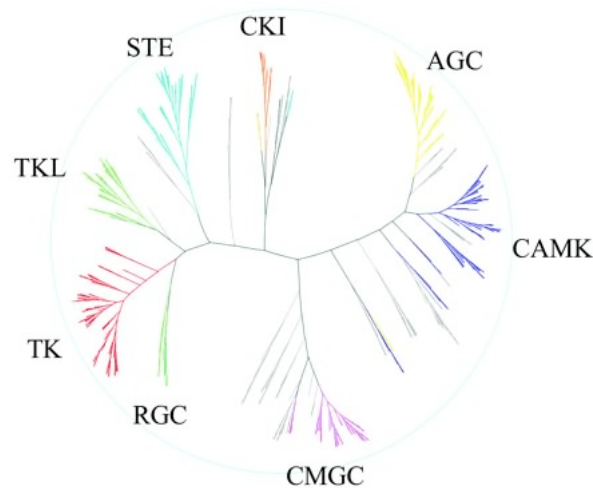


Abbildung 1: Dendrogramm von 491 humanen Proteinkinasedomänen. Die Klassifizierung der Kinasen in Gruppen basiert vorwiegend auf dem Sequenzvergleich der katalytischen Domänen, zusätzlich wurden die Sequenzähnlichkeit außerhalb der katalytischen Domäne sowie die biologische Funktion der Kinasen einbezogen. Die Gruppen werden bezeichnet als: 1) CAMK-Gruppe, Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase, 2) CMGC-Gruppe, CDK, MAPK, GSK3 und CLK Familien, 3) RGC (Rezeptor-Guanylat-Cyklase)-Gruppe, 4) TK-Gruppe, Tyrosinkinase, 5) TKL-Gruppe, Tyrosinkinase-ähnliche Gruppe, 6) STE-Gruppe mit Homologen der Hefe Sterile 7, Sterile 11 und Sterile 20 Kinasen, 7) CK1 (Caseinkinase)-Gruppe mit Caseinkinase 1, Tau-Tubulin-Kinasen und Vaccinia-verwandten Kinasen und 8) AGC-Gruppe mit den PKA, PKG, PKC Familien. Die neunte Gruppe der atypischen Kinasen, ist hier nicht markiert. Aus: Manning et al., 2002.

Die Superfamilie der Kinasen lässt sich nach ihrer Akzeptoraminosäure in zwei Gruppen einteilen: in Serin-/Threoninkinasen sowie in Tyrosinkinase. Serin, Threonin und Tyrosin sind in humanen Proteinen mit einem Gehalt von 8,5%, 5,7% bzw. 3,0% vertreten, die relative Häufigkeit von phosphorylierten Serin (pSer) zu phosphorylierten Threonin (pThr) zu phosphorylierten Tyrosin (pTyr) wurde durch spezielle Methoden mit ^{32}P -markierten Zellen jedoch zu 1800:200:1 ermittelt (Hunter and Sefton, 1980).

Die Mitglieder der Ser/Thr-Kinasen machen mit etwa 400 Vertretern 80% des gesamten humanen Kinoms aus. Sie können wiederum nach Art ihrer Regulation in Untergruppen eingeteilt werden. Hierzu gehören z.B. die durch Calcium/Calmodulin regulierten Kinasen, die durch zyklische Nukleotide regulierten Kinasen sowie die Cyclin-abhängigen Kinasen. Das in dieser Arbeit untersuchte Protein Cdk9 gehört zu den Cyclin-abhängigen Kinasen, auf diese wird in Kapitel 2.3 näher eingegangen. Die Gruppe der Ser/Thr-Kinasen weisen ferner unterschiedliche Substratspezifitäten auf. So gibt es die basophilen, die acidophilen und die Prolin-gerichteten Kinasen. Diese Bezeichnung erfolgt aufgrund der bevorzugten Aminosäuren in der Umgebung des zu phosphorylierenden Serin/Threonins (Kreegipuu et al., 1998; Zhu et al., 2005).

Tyrosinkinase sind mit über 90 Vertretern die zweitgrößte Gruppe des Kinoms und lassen sich in Rezeptor- (59 Kinasen) und Nichtrezeptortyrosinkinase (32 Kinasen) einteilen. Bei den Rezeptortyrosinkinase ist die Kinasedomäne integraler Bestandteil eines Transmembranrezeptors. Die auf der cytoplasmatischen Seite liegende Kinasedomäne wird durch Bindung von Liganden an die extrazelluläre Rezeptordomäne aktiviert. Beispiele für Rezeptortyrosinkinase sind der Insulinrezeptor und der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*Epidermal Growth Factor Receptor*, *EGFR*). Proteintyrosinkinase-Gene

wurden u.a. als Onkogene in humanen Tumoren oder transformierenden Retroviren identifiziert (Hunter, 2000).

2.2 Strukturelle Eigenschaften eukaryotischer Proteinkinasen

In ihrem aktiven Zustand weisen Proteinkinasen der Ser/Thr- und Tyr-Superfamilie eine konservierte katalytische Domänenarchitektur auf, die aus 250-300 Aminosäuren besteht (Hanks and Hunter, 1995; Huse and Kuriyan, 2002). Die erste bekannte Struktur einer eukaryotischen Proteinkinasedomäne war die der Protein Kinase A, die im Jahre 1991 mittels Röntgenkristallographie bestimmt wurde (Knighton et al., 1991). Eine Struktur dieser Kinase im Komplex mit einem Inhibitorpeptid ist in Abbildung 2 dargestellt. Bisher sind in der PDB die Strukturen 119 humaner Proteinkinasedomänen verzeichnet (<http://www.sgc.ox.ac.uk/research>).

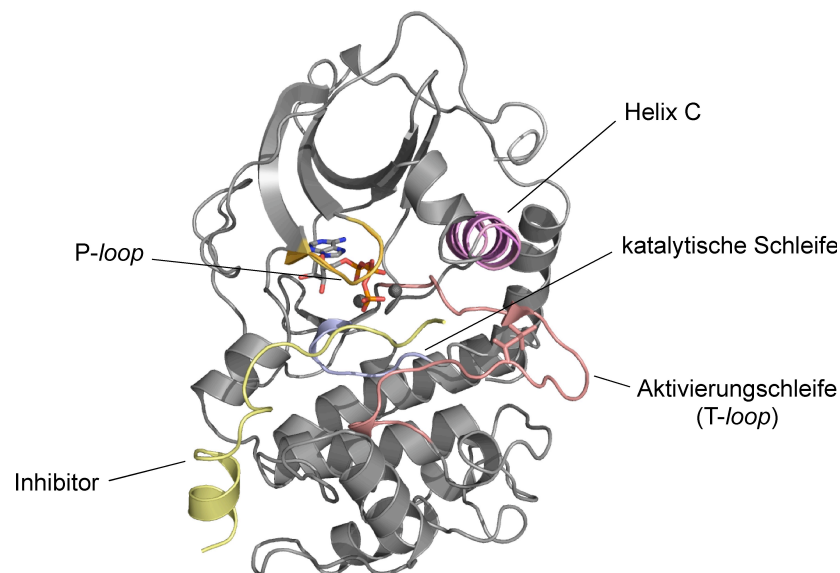


Abbildung 2: Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) mit MnATP und Peptidinhibitor (PDB:1ATP). Die in Kinasen konservierten Strukturelemente sind farblich markiert und beschriftet.

Die den Kinasen gemeinsame Faltung umfasst zwei Flügel (*lobes*), einen N-terminalen überwiegend aus β -Faltblättern und einer α -Helix bestehenden Flügel, sowie einen größeren α -helikalen C-terminalen Flügel. Die Bindungsstelle für das Adenosinnukleotid befindet sich innerhalb der von diesen beiden Flügeln ausgebildeten Spalte und ist derart orientiert, dass das γ -Phosphat des ATP zur Öffnung der Spalte gerichtet ist. Die Substratbindung wird von Resten des C-terminalen Flügels vermittelt.

Kinasen besitzen konservierte Strukturelemente, welche an der Nukleotidbindung sowie an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt sind. Die Nahe des N-Terminus zwischen dem ersten und zweitem β -Faltblatt liegende Schleife mit dem konservierten Sequenzmotiv $GxGx\phi G$ (ϕ ist gewöhnlich Tyrosin oder Phenylalanin) wird als Phosphat-Bindungsschleife (*Phosphate binding loop*, *P-loop*) bezeichnet. Die Aminosäuren des *P-loops* sind für die Orientierung und Bindung der Phosphate verantwortlich. Die einzige Helix im N-terminalen

Teil der Kinase wird Helix C oder in Cyclin-abhängigen Kinasen aufgrund der konservierten Aminosäuresequenz auch PSTAIRE-Helix genannt. Sie enthält einen invarianten Glutamatrest, welcher über eine Salzbrücke zu einem ebenfalls invarianten Lysin die Wechselwirkung dieses Lysins mit den α - und β -Phosphaten des Nukleotids stabilisiert. In der katalytischen Schleife der Kinase liegt ein konserviertes Aspartat, dem die Rolle als generelle Base der Phosphorylierungsreaktion zugeschrieben wird. Ein weiteres Strukturelement von Proteinkinasen ist die Aktivierungsschleife, die in Cyclin-abhängigen Kinasen auch als *T-loop* bezeichnet wird. Die Aktivierungsschleife wird von einem konserviertem DFG-Motif, dessen Aspartat an der Koordinierung des Magnesiumions und des ATP beteiligt ist und einem konserviertem APE-Motiv flankiert (Nolen et al., 2004). Die Aktivierung vieler Kinasen erfordert zusätzlich die Phosphorylierung eines in dieser Schleife vorhandenen spezifischen Ser-, Thr- oder Tyr-Restes. Anhand der Sequenzmotive der ATP-Bindungsregion und der katalytischen Schleife lassen sich die meisten Kinasen mit Hilfe bioinformatischer Methoden einzig anhand ihrer Aminosäuresequenz identifizieren, eine Ausnahme bilden einige virale Kinasen, welche in diesen Bereichen eine hohe Abweichung zeigen (<http://expasy.ch/prosite/PDOC00100>).

In den folgenden Kapiteln wird die Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen näher beschreiben, ein Schwerpunkt wird dabei auf die bisher bekannten Regulationsmechanismen von Cdks gelegt.

2.3 Die Familie der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen

Cdks bilden mit 13 Mitgliedern eine Untergruppe der Ser/Thr spezifischen Proteinkinasen. Sie bestehen oft aus nicht mehr als der katalytischen Kinasedomäne und ihre Aktivität erfordert die Assoziation mit einem Cyclin sowie in vielen Fällen eine Phosphorylierung im *T-loop* der Kinase (Morgan, 1997; Pavletich, 1999). Die Bindung des Cyclins an das Cdk-Protein induziert drastische Konformationsänderungen in der Kinase, die Voraussetzung für eine starke ATP-Bindung sind. Cdks gehören zu den Prolin-gerichteten Kinasen, die Substratspezifität gegenüber Ser/Thr Resten in einem (S/T)P-Motiv aufweisen (Zhu et al., 2005). Sie sind nicht nur an der Kontrolle der Zellzyklus-Progression beteiligt, sondern spielen ebenfalls eine wichtige Funktion in anderen zellulären Prozessen, wie z.B. der Transkription, Apoptose und der Zelldifferenzierung. Auch in neuronalen Prozessen sind Cdks involviert. Abbildung 3 stellt eine Übersicht der von verschiedenen Cdk-Cyclin Paaren regulierten zellulären Prozesse dar.

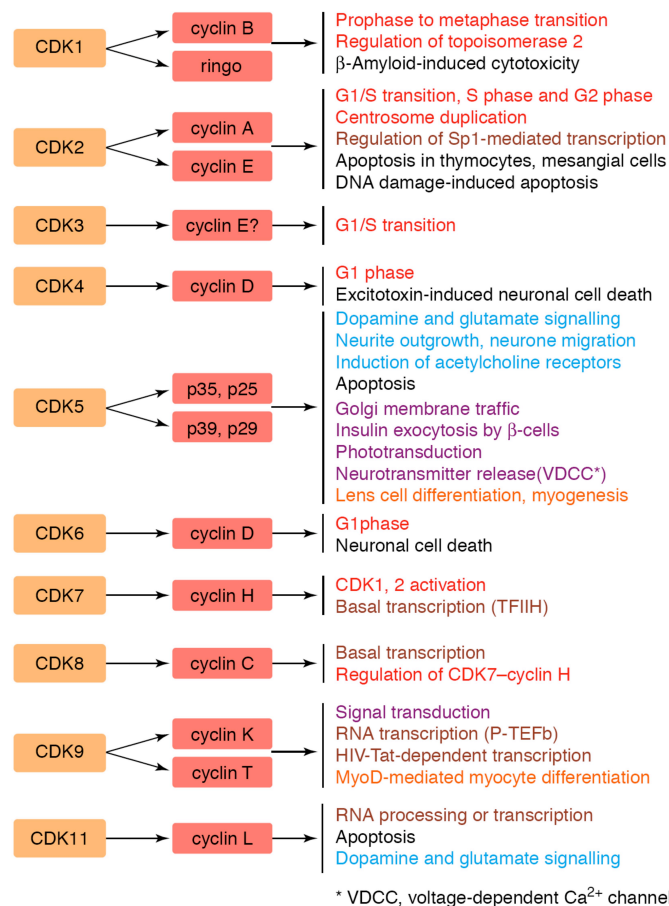


Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Cdk-Cyclin Paare und der von ihnen regulierten zellulären Prozesse. Diese Prozesse werden in verschiedene Gruppen unterteilt und sind farblich markiert: Zellzykluskontrolle (rot), Transkription (braun), neuronale Vorgänge (cyan), Differenzierung (orange), Apoptose (schwarz) und sonstige Prozesse (lila). Entnommen aus: Knockaert et al., 2002.

Die Abbildung zeigt, dass Cdk1, Cdk2, Cdk4 und Cdk6 diejenigen Kinasen bilden, die für ein kontrolliertes Durchlaufen des Zellzyklus wichtig sind. Bei vielen transformierten Zellen wird eine erhöhte Aktivität dieser Kinasen beobachtet. Diese Aktivitätserhöhung ist häufig auf eine gesteigerte Expression der regulatorischen Cyclin-Untereinheit oder einer Runterregulierung von Cdk-Inhibitoren zurückzuführen (Noble et al., 2005b). Die Deregulation der Kinasen, nicht nur im Kontext der Krebsentstehung, sondern auch bei der Entstehung anderer Krankheiten, wie z.B. bei einigen neurodegenerativen oder vaskulären Krankheiten, hat zu einer intensiven Suche nach selektiven Cdk-Inhibitoren geführt. Einige dieser Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien, eine Zulassung ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch für keinen Cdk-Inhibitor erteilt worden (Noble et al., 2004). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Cdk9-CyclinT1 Heterokomplex, der nicht zu den Zellzyklus Cdk-Cyclin Paaren gehört, sondern eine entscheidende Rolle bei der Transkription einnimmt. Dieser Komplex wird auch als P-TEFb bezeichnet und in Kapitel 2.5 eingeführt.

2.4 Regulation Cyclin-abhängiger Proteinkinasen

2.4.1 Cyclin Bindung und Phosphorylierung

Anhand des Cdk2-CycA Heterokomplexes soll ein kurzer Einblick in die möglichen Aktivitätszustände Cyclin-abhängiger Kinasen gegeben werden, da über diese Kinase umfassende funktionelle und strukturelle Daten vorliegen.

Cdk2 in isolierter Form, d.h. ohne assoziiertes Cyclin, besitzt keine detektierbare Kinaseaktivität. Die Ursache hierfür liegt zum einen darin, dass der *T-loop* die Bindungsstelle für das Proteinsubstrat verdeckt und zum anderen daran, dass die Konformation der PSTAIRE-Helix keine starke Bindung des ATP erlaubt (Abbildung 4). Die Bindung an das Cyclin führt zu einer Bewegung der PSTAIRE-Helix in die katalytische Spalte hinein. Hierdurch gelangt das konservierte Glutamat der Helix in Nähe des Lysins und kann wie bereits beschrieben an der Ausrichtung der Phosphate des ATP beitragen. Ferner kommt es durch die Assoziation mit dem Cyclin zu Strukturänderungen im *T-loop*, die ein Threonin in dieser Schleife (Thr160 für Cdk2) für eine aktivierende Phosphorylierung zugänglich macht. Diese wird im Falle von Cdk2 von der Cdk-aktivierenden Kinase (*Cdk activating kinase*, CAK) ausgeführt, die sich aus Cdk7-CycH sowie einem weiterem Protein namens MAT1 zusammensetzt (Kaldis, 1999). Die Phosphorylierung bewirkt weitere Konformationsänderungen, vornehmlich im *T loop* der Kinase, die zur Ausbildung der Substratbindungsstelle und zur vollen Aktivität der Kinase führen. Das Phosphothreonin nimmt dabei die Rolle als organisierendes Zentrum ein, das Interaktionen mit drei Argininen der Kinase sowie mit Resten des Cyclins eingeht (Russo et al., 1996). Eine negative Regulation von Cdks kann ebenfalls durch inhibitorische Phosphorylierungen erfolgen, in Cdk2 ist dies die Phosphorylierung von Thr14 und Tyr15 (Morgan, 1997).

Im Gegensatz zu den Cdk-Cyclin Komplexen des Zellzyklus, über die detaillierte Informationen vorliegen, ist bisher nur wenig über die Cdk-Cyclin Komplexe bekannt, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Ungeklärt ist deshalb, ob der Aktivierungsmechanismus von Cdk2 auf alle Cdks zutrifft. So weist z.B. Cdk8 einen längeren *T-loop* auf, der anstelle des zu phosphorylierenden Ser oder Thr ein Aspartat enthält (Hoepfner et al., 2005). In der erst vor kurzem gelösten Struktur des Cdk9-Cyclin T1 Komplexes weist Cyclin T1 eine um 26° veränderte Orientierung als CycA im Cdk2-CycA Komplex auf (Baumli et al., 2008).

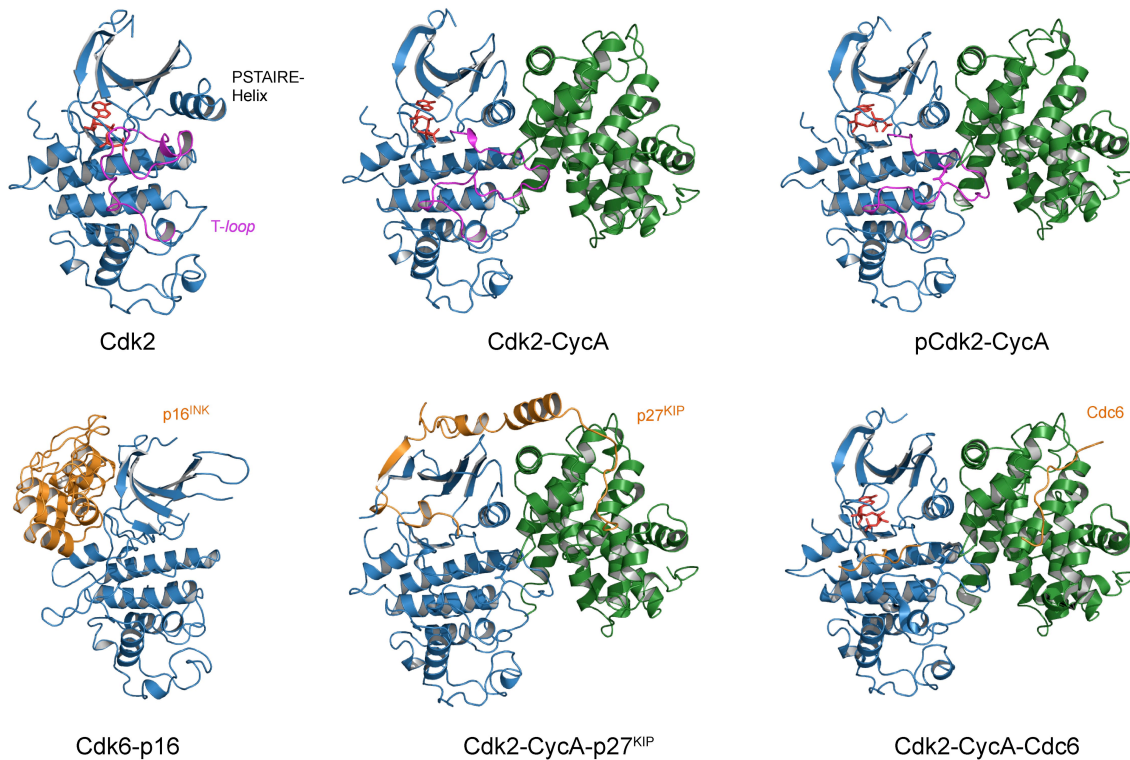


Abbildung 4: Kristallstrukturen von Cdk2 in verschiedenen Aktivitätszuständen: nicht aktiver (freies Cdk2), teilweise aktiver (Cdk2-CycA Komplex) und aktiver (phosphorylierter Cdk2-CycA Komplex) Zustand sowie die inaktiven Zustände (Cdk6-p16^{INK} Komplex und Cdk2-CycA-p27^{KIP} Komplex). In der oberen Reihe ist der T-loop der Kinase in Magenta hervorgehoben. Unten rechts: Struktur des Cdk2-CycA Komplexes mit dem Substrat Cdc6. Nur ein Teil des Cdc6 Substrats ist sichtbar, der zentrale Bereich zwischen dem Cyclin-Erkennungsmotiv und dem Cdk-Phosphorylierungsmotiv sind in der Struktur nicht aufgelöst. Abbildung modifiziert nach: Pavletich, 1999. PDB Codes der Strukturen von links nach rechts: 1HCK, 1FIN, 1JST, 1BI7, 1JSU und 2CCI.

Zellzyklus-Cycline sind charakteristischen, oszillierenden Konzentrationsänderungen im Laufe des Zellzyklus unterworfen. Verschiedene Regulationsmechanismen sind dabei für die Kontrolle der Cyclin-Konzentrationen verantwortlich. So ist z.B. die Expression der Cycline streng reguliert, ebenso wie ihr gezielter Abbau durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse zu bestimmten Punkten des Zellzyklus (Morgan, 1997). Diese unterschiedliche Verfügbarkeit stellt einen weiteren Regulationsmechanismus dar, da die Anwesenheit des Cyclins essentiell für die Kinaseaktivität ist.

Eine weitere Funktion der Cycline ist die Lokalisierung von Cdk2 zu bestimmten subzellulären Kompartimenten. So gibt es zwei mitotische Cdk1-Cyclin B Komplexe, welche an unterschiedlichen Orten in der Zelle lokalisiert sind. Der Heterokomplex Cdk1-CycB2 ist vorwiegend am Golgi-Apparat lokalisiert. Dagegen befindet sich Cdk1-CycB1 in der Interphase im Cytoplasma der Zelle und wandert kurz vor dem Zusammenbruch der Kernmembran in den Zellkern. Dort akkumuliert der Heterokomplex am Spindelapparat. Durch diese verschiedene Lokalisation steht der Kinase ein unterschiedliches Repertoire an Substraten gegenüber (Jackman et al., 1995; Übersax and Ferrell, 2007).

Zusätzlich zu ihrer aktivierenden Funktion können Cycline durch direkte Substratbindung einen Einfluss auf die Substraterkennung der Kinase ausüben. Die Cycline A, B, D und E weisen einen exponierten hydrophoben Bereich auf (Brown et al., 1995), der als Rekrutierungsstelle für Substrate mit einem konservierten RxL- oder KxL-Motiv (x: beliebige

Aminosäure) dient (Brown et al., 1999; Schulman et al., 1998). RxL-Motive wurden zuerst in den Cdk2 Substraten p107, p130 und den Inhibitoren p21 und p27 beschrieben (zusammengefasst in (Lowe et al., 2002)). Strukturelle Studien mit pCdk2-CycA sowie einem Modellsubstrat- und Rekrutierungspeptid von p107 haben gezeigt, dass die RxL-Bindungsstelle ca. 40 Å von der katalytischen Stelle entfernt liegt (Brown et al., 1999). Experimente mit Cdk2-CycA und Cdk2-CycE sowie Cdc6 basierten Peptiden, die eine unterschiedliche *Linker*-Länge zwischen dem RxL-Motiv und der Phosphorylierungsstelle aufweisen, zeigen, dass eine minimale *Linker*-Länge von 15 Resten für die Phosphorylierung dieser Peptide erforderlich ist (Takeda et al., 2001). Die bisher bekannten Cdk2-CycA Substrate weisen eine Distanz von mindestens 17 Aminosäuren zwischen den beiden Motiven auf (Cheng et al., 2006). Zusätzlich zu dem hydrophoben Bereich scheinen weitere Reste auf dem Cyclin für die Substraterkennung verantwortlich zu sein, da es Unterschiede zwischen Cyclinen gibt, RxL-enhaltende Substrate zu binden. So bindet Cdk2-CycA das Substrat p107, das jedoch von Cdk2-CycB nicht gebunden wird (Peeper et al., 1993). Noch ungeklärt ist der Mechanismus, nach dem die RxL-Erkennungsstelle auf dem Cyclin die Substratphosphorylierung vermittelt. Unter anderem wird vorgeschlagen, dass der hydrophobe Bereich die Substratkonzentration in der Nähe der katalytischen Stelle erhöhen soll (Schulman et al., 1998). Synthetische Peptide mit einem RxL-Motiv wurden erstmals 1999 als pharmakologische Inhibitoren der Cdk2 Aktivität gegenüber RXL-enhaltenden Substraten beschrieben (Chen et al., 1999).

2.4.2 Inhibition durch Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren

Cdks, die an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind, können durch Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (*cyclin dependent kinase inhibitors*, CKI) der INK4 Familie oder CIP/KIP Familie inhibiert werden (Abbildung 4).

Zu der INK4A Familie gehören die Proteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Die INK4 Inhibitoren weisen als gemeinsames Strukturmotiv Ankyrin-Wiederholungen auf und binden vornehmlich freies Cdk4 und Cdk6, wobei auch vorgeformte Cdk4/6-CyclinD Komplexe gebunden werden können. Dies ist möglich, da sich die Inhibitor- und Cyclin-Bindungsstelle auf gegenüberliegenden Seiten der Kinase befinden. Die Bindung des Inhibitors findet durch Interaktionen mit beiden Flügeln der Kinase statt und führt zu einer relativen Rotation dieser Flügel zueinander. Diese veränderte Konformation verhindert die Assoziation mit dem Cyclin. Zusätzlich wird durch den INK4 Inhibitor die Integrität der ATP-Bindungsstelle aufgehoben und hierdurch die Affinität für das ATP stark herabgesetzt (Russo et al., 1998). Dies erklärt die inhibitorische Wirkung gegenüber Cdk-Cyclin Komplexen.

Die CIP/KIP Familie von Inhibitoren beinhaltet die Mitglieder p21^{CIP}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}. Der N-terminale Abschnitt dieser Inhibitoren enthält ein konserviertes RxL-Motiv, welches die Cyclin-Bindung vermittelt. Die inhibitorische Wirkung findet unter anderem über die Insertion einer 3₁₀-Helix in den N-terminalen Flügel der Kinase statt. Ein in allen CIP/KIP Proteinen konserviertes Tyrosin ahmt dabei die Puringruppe des ATP nach. Carbonylgruppen des C-terminalen Helixrückgrates gehen Kontakte mit dem konservierten Lysin der Kinase ein, welches die α - und β -Phosphate koordinieren würde (Pavletich, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass auch ohne die Anwesenheit dieser 3₁₀ Helix eine Inhibition der Kinaseaktivität

möglich ist. Die Ursache hierfür ist eine starke Restrukturierung des N-terminalen Flügels der Kinase durch Bindung des Inhibitors.

Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass p27^{Kip} als vorwiegend unstrukturiertes Polypeptid vorliegt (Lacy et al., 2004). Lediglich der Abschnitt zwischen der konservierten Cyclin-Bindungsstelle (Domäne 1) und Cdk-Bindungsstelle (Domäne 2), die sogenannte *linker* Region, weist eine partielle α -helikale Struktur auf. Diese Sekundärstruktur ist trotz geringer Sequenzhomologien auch in p21 und p57 konserviert (Adkins and Lumb, 2002; Kriwacki et al., 1996). Für die Bindung von p27^{Kip} an Cdk2-CycA wird ein sequenzieller Mechanismus vorgeschlagen, der mit der Bindung des Inhibitors an CycA beginnt. Diese Bindung hat eine weitere Faltung der Linker-Region zur Folge, sowie die anschließende Bindung der Domäne 2 an Cdk2.

2.5 Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb)

Der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb) besteht aus der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk9 sowie einem regulatorischen Cyclin T (Price, 2000).

Die Bedeutung von P-TEFb als Elongationsfaktor der Transkription ist auf Untersuchungen mit dem ATP-Analogon 5,6-Dichloro-1- β -D-Ribofuranosylbenzimidazol (DRB) zurückzuführen. Behandlung von Säugerzellen mit DRB führte zwar zu einer Initiation der RNA-Synthese, der überwiegende Teil der RNA-Polymerase II (RNA Pol II) Moleküle stoppte jedoch kurz nach der Initiation und entließ kurze RNA-Transkripte. Dies deutete darauf hin, dass DRB den Übergang der Polymerase in die Elongation beeinflusst (Marshall and Price, 1992; Tamm et al., 1980). Auf Grundlage der damals bekannten Ergebnisse wurde ein Model aufgestellt, nach welchem die RNA Pol II kurz nach der Initiation durch negative Transkriptionsfaktoren (*negative transcription elongation factor*, N-TEF) gestoppt wird und die Wirkung eines positiven Transkriptionselongationsfaktor (*positive transcription elongation factor*, P-TEF) erfordert, der diesen Arrest wieder aufheben kann.

Die Identität dieses P-TEF blieb zunächst unklar, bis 1995 aus *Drosophila*-Zellextrakt ein aus zwei Proteinen bestehender Faktor gereinigt wurde, der P-TEFb genannt wurde. Dieser Faktor stimulierte in einer DRB-Abhängigkeit die Produktion langer mRNA-Transkripte (Marshall and Price, 1995). Sequenzanalysen ergaben, dass ein als PITALRE bekanntes Protein das humane Homolog zu der kleinen Untereinheit des aus *Drosophila* gereinigten Faktors darstellte (Zhu et al., 1997). Schon 1994 wurde ein Protein isoliert, dass aufgrund seines vorhandenen Motivs als PITALRE bezeichnet wurde und dessen zelluläre Funktion nicht bekannt war (Graña et al., 1994). Kurz nach der Reinigung von P-TEFb wurde gezeigt, dass dieser Faktor Kinaseaktivität besitzt und die C-terminale Domäne der RNA-Pol II phosphoryliert (Marshall et al., 1996). Die zu PITALRE entsprechende Cyclin-Untereinheit wurde von zwei Gruppen unabhängig voneinander identifiziert. Zunächst wurde die Cyclin-Untereinheit als zellulärer Kofaktor des HIV-1 Tat Proteins gereinigt. Die Klonierung dieses Proteins ergab, dass es sich um ein Cdk9 assoziiertes Cyclin handelt (Wei et al., 1998). Der Heterokomplex aus Cdk9-CycT1 stellt den Zielkomplex des viralen Tat Proteins dar, der essentiell für die Transkription des HIV-Genoms ist (2.6.5). Ferner erfolgte die Identifizierung des Cyclins über die Klonierung der cDNS der größeren Untereinheit des *Drosophila* Komplexes. Die cDNS codierte für ein Protein mit einem Cyclin-Box-Motiv, das

aufgrund seiner Transkriptionsabhängigkeit als Cyclin T (Transkription) bezeichnet wurde. Die mit diesem Cyclin assoziierte Kinase-Untereinheit wurde von PITALRE in Cdk9 umbenannt (Peng et al., 1998a). In humanen Zellen sind insgesamt vier verschiedene Cyclin-Untereinheiten als Bindungspartner von Cdk9 bekannt: CycT1, CycT2a, CycT2b und CycK (Fu et al., 1999; Peng et al., 1998b). CycT2b besitzt gegenüber CycT2a 67 zusätzliche C-terminale Aminosäuren, die auf unterschiedliches Spleißen zurückzuführen sind. Ein charakteristisches Strukturmerkmal der Cycline sind zwei Cyclin-Boxen, die aus jeweils fünf Helices (H1-H5 und H1'-H5') bestehen und von N- und C-terminalen Helices flankiert werden (Anand et al., 2007). Der P-TEFb Komplex, bestehend aus Cdk9 und CycT1, ist der am häufigste vorkommende Komplex. In HeLa Zellen sind 80% des vorhandenen Cdk9 mit Cyclin T1 assoziiert (Peng et al., 1998b). Im Vergleich zu den Zellzyklus-Cyclinen wird Cyclin T1 konstitutiv exprimiert und die Konzentration von P-TEFb variiert nur wenig während des Zellzyklus (Garriga et al., 2003). Vor einigen Jahren wurde eine weitere Isoform von Cdk9 identifiziert, die eine 117 Aminosäuren lange N-terminale Verlängerung gegenüber Cdk₄₂ besitzt und aufgrund ihres Molekulargewichts Cdk₅₅ genannt wird (Shore et al., 2003). Die beiden Proteine weisen dieselben Eigenschaften auf, zeigen aber unterschiedliche Expressionsniveaus und treten in verschiedenen Gewebetypen auf (Shore et al., 2005). Cdk_{9₅₅} wurde vor kurzem eine Rolle bei der Regeneration von Muskelzellen zugeschrieben (Giacinti et al., 2008). Erst kürzlich wurde die Kristallstruktur des aktiven P-TEFb (Cdk9/CycT1) Komplexes gelöst (Baumli et al., 2008). Diese ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

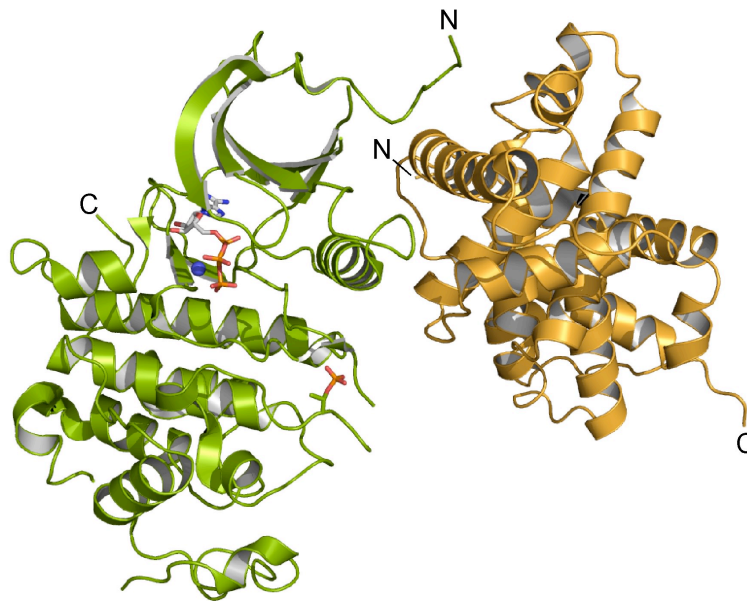


Abbildung 5: Kristallstruktur von P-TEFb im aktiven Zustand. Cdk9 1-330 ist in grün und die Cyclin-Boxen von Cyclin T1 1-259 sind in orange dargestellt. Das Phosphothreonin in der Aktivierungsschleife der Kinase sowie das von der Kinase gebundene Nukleotid (AMPPNP) sind als *ball-und-stick* Model und das gebundene Magnesiumion als blauer Kreis gezeigt (PDB: 3BLQ, Baumli et al., 2008)

Die Struktur von Cdk9 und Cyclin T1 zeigt Ähnlichkeiten mit bisher bekannten Cdk-Cyclin-Strukturen. Eine Besonderheit der P-TEFb Struktur stellt jedoch die Orientierung der beiden Untereinheiten zueinander dar, da die Position von Cyclin T1 verglichen mit der CycA-

Position im Cdk2-CycA Komplex um 26°C rotiert ist. Die Interaktionsfläche von Cdk9 und Cyclin T1 ist hierdurch verglichen mit der anderer Cdk-Cyclin-Paare bedeutend kleiner. Aufgrund dieser speziellen Orientierung der beiden Moleküle zueinander kann das Cyclin nicht zu der Bindung des pThr beitragen, wie es bei Cdk2-CycA der Fall ist. Das pThr in Cdk9 ist bedeutend exponierter als pThr in Cdk2 und wirkt nur bedingt als organisierendes Zentrum. Die Phosphorgruppe nimmt jedoch eine entscheidende Funktion ein, indem sie das Aktivierungssegment korrekt für die Substraterkennung positioniert. Die Kinase, welche für die Aktivierung von P-TEFb verantwortlich ist, wurde jedoch noch nicht identifiziert. Neueste Ergebnisse weisen darauf hin, dass Thr186 sowie drei weitere Reste im C-terminalen Bereich der Kinase, in *cis* autophosphoryliert werden können (Baumli et al., 2008).

Cdk9 besitzt eine nicht-polare Tasche im Aktivierungssegment, die nur ein Prolin, jedoch keine andere Aminosäure beherbergen kann. Die durch das pThr hervorgerufene Konformation generiert somit die Spezifität von Cdk9 gegenüber Substraten mit einem Ser/Pro-Motiv, wie z.B. der CTD der RNA-Pol II (Baumli et al., 2008; Brown et al., 1999). Cyclin T1 besitzt im Gegensatz zu den Zellzyklus-Cyclinen aufgrund struktureller Besonderheiten keine Bindestelle für RxL-Motive. Anhand der vor kurzem veröffentlichten Kristallstruktur von Cyclin T1 im Komplex mit Tat-TAR-RNA konnte jedoch eine Tat-Interaktionsregion identifiziert werden, die in einer für Cyclin T1 spezifischen Schleife zwischen der vierten und fünften Helix in der ersten Cyclin-Box liegt (Anand et al., 2007; Anand et al., 2008).

Die Aktivität von P-TEFb ist essentiell für die Transkription der meisten Proteincodierenden Gene sowie für die Transkription des HIV-Genoms. Behandlung von Zellen mit Flavopiridol, einem Cdk9 Inhibitor, führt zu einer Reduktion der RNA-Pol II Transkription um etwa 70% (Chao and Price, 2001). Da P-TEFb eine äußerst bedeutende Funktion während des Transkriptionszyklus einnimmt, soll an dieser Stelle zunächst in das Thema Transkription eingeführt werden. Dabei wird der Schwerpunkt auf die Phase der Elongation gelegt, die durch P-TEFb reguliert wird. Im Anschluss werden die Bedeutung von P-TEFb bei der HIV-1 Genregulation sowie die regulatorischen Faktoren von P-TEFb näher beschrieben. Zu diesen gehören u.a. das Protein Hexim1 sowie die 7SK snRNA, die Gegenstand dieser Arbeit sind.

2.6 Die Transkription in Eukaryoten

Der Begriff Transkription beschreibt den Prozess der RNA Synthese ausgehend von einer DNA-Vorlage. In Eukaryoten wird die Transkription von drei DNA-abhängigen RNA-Polymerasen ausgeführt, der RNA Polymerase I, Pol II und Pol III (Polymerase, Pol).

Die RNA-Pol I ist für die Synthese der ribosomalen RNA (*ribosomal RNA*, rRNA) verantwortlich, RNA-Pol II synthetisiert Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) sowie kleine nukleäre RNAs (*small nuclear RNA*, snRNA). Pol III produziert Transfer-RNAs (*transfer RNA*, tRNA) und die 5S ribosomale RNA (zusammengefasst in (Cramer et al., 2008)). Die Untereinheiten von Polymerasen unterschiedlicher Organismen weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf und der Mechanismus der Nukleotid-Inkorporation scheint in allen Organismen ähnlich zu sein (Ebright, 2000; Steitz, 1998). Die absolute Anzahl und das Verhältnis der an der Transkription beteiligten Faktoren am Genom korreliert jedoch mit der Komplexität eines Organismus (Levine and Tjian, 2003).

Die Transkription von mRNA durch die RNA-Pol II ist ein komplexer und streng regulierter Prozess, der das Zusammenwirken vieler unterschiedlicher Komponenten erfordert (siehe Abbildung 6). RNA-Pol II selbst ist ein 514 kDa schwerer Multiproteinkomplex, der aus einem aus zehn Untereinheiten bestehenden Kern, sowie einem Heterodimer der Untereinheiten Rbp4 und Rbp7 am Rande des Kerns, aufgebaut ist (Cramer et al., 2008). RNA-Pol II besitzt als einzige der drei Polymerasen an der größten Untereinheit Rbp1 eine konservierte C-terminale Domäne (*C-terminal domain*, CTD), die umfassenden Modifizierungen während des Transkriptionszyklus unterlegen ist. Die Kristallstruktur eines gesamten RNA-Pol II Komplexes aus Hefe wurde erstmals 2003 gelöst (Armache et al., 2003; Armache et al., 2005; Cramer et al., 2001). Zusammen mit den generellen Transkriptionsfaktoren TFII-A, -B, -D, -E, -F und -H bildet RNA-Pol II die basale Transkriptionsmaschinerie, die in Eukaryoten strukturell und funktionell konserviert ist (Naar et al., 2001). Über 100 Proteine sind allein an dem Transkriptionskomplex beteiligt. Für eine regulierte, Gen-spezifische Transkription sind jedoch weitere Faktoren, die sogenannten sequenzspezifischen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren erforderlich. Diese binden an promotornahe (proximale) oder weiter vom Promotor entfernte (distale) DNA-Elemente (*Enhancer*) und üben eine aktivierende oder repressive Funktion auf die Transkription aus. Die sequenzspezifischen Faktoren rekrutieren über Protein-Protein Interaktionen Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, die eine Art Adapterfunktion einnehmen und regulatorische Signale an die RNA-Pol II weiterleiten (zusammengefasst in Kadonaga, 2004; Naar et al., 2001). Einen zentralen Co-Akturator stellt der Mediator-Komplex dar, ein aus über 30 Polypeptiden bestehender Komplex, der essentiell für die Transkription von fast allen Pol II Promotoren ist (Kornberg, 2005). Zu den Co-Faktoren gehören ebenfalls Chromatin-modifizierende Enzyme. Diese beeinflussen durch kovalente Histonmodifizierungen oder Remodellierung der Nukleosomen die Zugänglichkeit der DNA (Kadonaga, 2004; Narlikar et al., 2002).

In den letzten Jahren wurden einer Reihe nicht-codierender RNAs (*non-coding RNA*, ncRNA) regulatorische Eigenschaften bei der Transkription zugeschrieben (Goodrich and Kugel, 2006; Prasanth and Spector, 2007). Diese nicht-codierenden RNAs wirken auf unterschiedliche Art und Weise, wie in Abbildung 6 gezeigt wird. So bindet und reguliert die 7SK snRNA die Aktivität des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb (siehe 2.7.1). Andere RNAs, wie z.B. die B2 RNA binden direkt die RNA-Pol II und inhibieren die RNA-Synthese. Das Expressionsniveau eines Gens wird durch das regulierte Zusammenwirken aller Faktoren festgelegt.

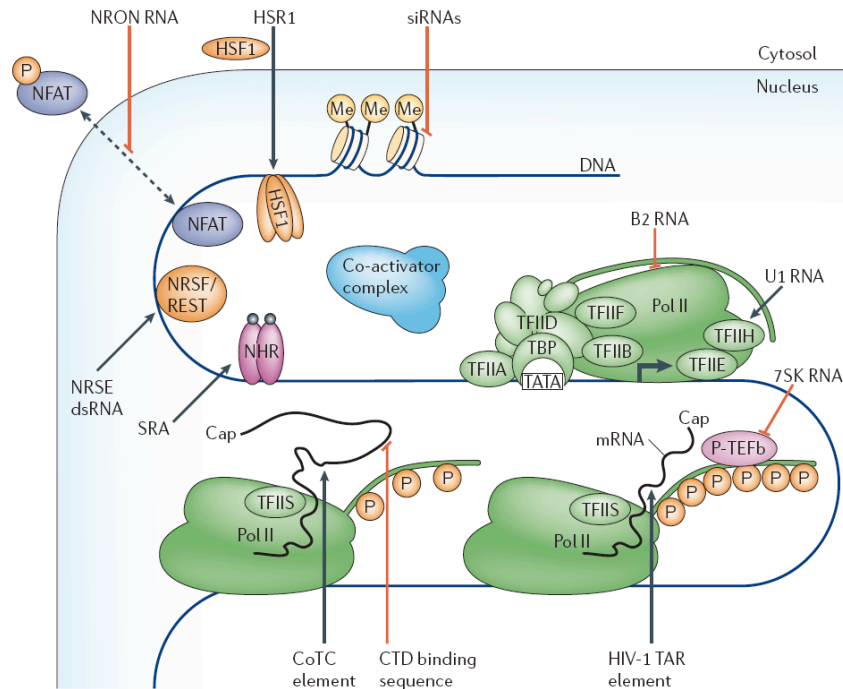


Abbildung 6: RNA-Polymerase II vermittelte Transkription in Eukaryoten. Die Transkription durch die RNA-Pol II ist ein komplexer Prozess, der aus mehreren Schritten aufgebaut ist und auf unterschiedliche Arten reguliert werden kann. Diese Regulation findet u.a. durch verschiedene Proteinfaktoren, der Struktur des Chromatins als auch über das mRNA-Transkript statt. Dargestellt sind hier drei sich in unterschiedlichen Phasen der Transkription befindliche Polymerase-Komplexe: eine am Promotor (dargestellt durch TATA) gebundene Polymerase, eine Polymerase, die sich über die Transkriptionsstartstelle hinausbewegt hat, sowie eine Polymerase im Elongationszustand. Nicht-codierende RNAs nehmen ebenfalls an der Regulation der Transkription teil. Schwarze Pfeile bzw. rote Balken markieren die Zielkomplexe der entsprechenden ncRNAs und zeigen, ob die entsprechende ncRNA eine stimulatorische bzw. inhibitorische Wirkung auf die Transkription ausübt. Abkürzungen: CoTC, co-transkriptionales *cleavage*; CTD, C-terminale Domäne; HIV-1 TAR, humanes Immundefizienzvirus-1 Transaktivierungs-*response*-Element; HSF-1, Hitzeschockfaktorprotein-1; HSR1, Hitzeschock-RNA-1; Me, Methylgruppe; NFAT, nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen; NHR, nukleärer Hormonrezeptor; NRON, nicht-codierender Repressor von NFAT; NRSE, neuron-restriktive *silencer*-Element doppelsträngige RNA; NRSF/REST, neuron-restriktiver *silencing* Faktor/RE-1 *silencing*-Transkriptionsfaktor; P, Phosphorylgruppe; P-TEFb, positiver Transkriptionselongationsfaktor b; siRNA, kurze interferierende ncRNA; SRA, Steroidrezeptor RNA-Aktivator; TATA, TATA-Box; TBP, TATA-bindendes Protein; TF, Transkriptionsfaktor, entnommen aus: Goodrich und Kugel, 2006.

2.6.1 Die Carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II

Die RNA-Pol II besitzt an ihrer größten Untereinheit Rbp1 eine ungewöhnliche C-terminale Domäne, die aus Wiederholungen der Konsensussequenz $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ aufgebaut ist. Die CTD in Säugern ist zu über 99% konserviert und essentiell für das Überleben eines Organismus. Deletion oder Verkürzung auf eine bestimmte Anzahl nicht-kanonischer Wiederholungen führt zum Zelltod (Chapman et al., 2007; Phatnani and Greenleaf, 2006). Die Anzahl der CTD-Heptade korreliert mit der Komplexität des Organismus. So besitzt z.B. die humane CTD 52, die CTD in *D.melanogaster* 45 und die CTD in *S.cerevisiae* 26 Heptad-Wiederholungen. In Säugern folgen jedoch nur 21 der 52 Heptade der Konsensussequenz. Diese Heptade liegen überwiegend proximal zu der Linker-Region, welche die CTD mit dem RNA-Pol II Kernkomplex verbindet. Die distalen Heptade weisen vornehmlich Abweichungen an der siebten Position auf. Das letzte Heptad ist fast ausschließlich aus nicht-Konsensus-Resten aufgebaut und ist wichtig für die Stabilität der CTD (Chapman et al., 2008; Chapman

et al., 2004). Genetische Analysen weisen darauf hin, dass die minimale funktionale Einheit aus zwei Heptaden besteht (Stiller and Cook, 2004).

Während des Transkriptionszyklus ist die CTD umfassenden post-translationalen Modifizierungen unterlegen, von denen die Phosphorylierung an Ser2 und Ser5 die häufigste Modifikation darstellt. Drei verschiedene Cdk-Cyc Paare, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Transkriptionszyklus wirken, sind für die Phosphorylierung verantwortlich. In ihrer hyperphosphorylierten Form enthält die CTD rund 50 Phosphatgruppen (Payne and Dahmus, 1993).

Der heterodimere Cdk7-CycH Komplex ist Bestandteil des TFIIF und phosphoryliert ebenso wie der Cdk8-CycC Komplex Ser5 der CTD. Die nachfolgende Phosphorylierung von Ser2 durch P-TEFb erfolgt überwiegend in Konsensus-Wiederholungen und ist essentiell für den Übergang in die Elongationsphase der Transkription (Kapitel 2.6.3). Ferner kann die CTD durch cis/trans-Isomerisierung der Proline modifiziert werden (Meinhart et al., 2005). In der folgenden Abbildung sind schematisch eine Heptad-Wiederholung sowie die modifizierenden Proteine bzw. Proteinkomplexe dargestellt.

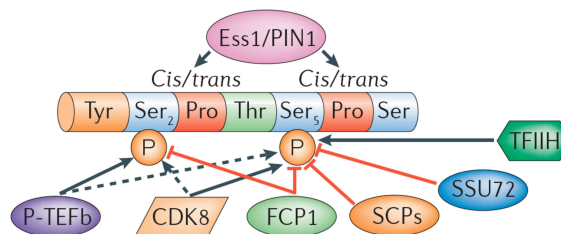


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines CTD-Heptads und der CTD-modifizierenden Proteine. Die CTD wird an den Positionen Ser2 und Ser5 durch die abgebildeten Kinasen phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen können durch Phosphatasen wieder entfernt werden (rote Balken). Ess1 (Hefe) und PIN1 (Mensch) sind Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, die die Struktur der CTD durch cis-trans-Isomerisierung der Proline verändern können. Aus: Saunders et al., 2006.

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass die RNA-Pol II CTD während der Transkription von snRNA und einigen Protein-codierenden Genen auch an Ser7 phosphoryliert vorliegt (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). Mutationsstudien zeigten, dass diese Ser7-Phosphorylierung essentiell für die Transkription von snRNA Genen ist. Unklar ist jedoch, welche Rolle diese Modifikation bei der mRNA-Synthese einnimmt, ebenso welche Kinase für die Phosphorylierung verantwortlich ist.

Die CTD stellt eine Bindungsplattform für Faktoren dar, die an der Transkriptionsregulation und mRNA-Prozessierung beteiligt sind (Phatnani and Greenleaf, 2006). Diese Faktoren erkennen spezifische Konformationen und Phosphorylierungsmuster in der CTD. Es wurde vermutet, dass die Modifizierungen der CTD eine Art Code festlegen, der diese regulatorischen Faktoren dem entsprechend zu bestimmten Zeitpunkten an die CTD rekrutiert (Buratowski, 2003). In den Kristallstrukturen der RNA-Pol II aus Hefe ist die CTD aufgrund ihrer Flexibilität nicht sichtbar (Armache et al., 2005; Cramer et al., 2001). Jedoch sind bisher einige Strukturen von CTD-bindenden Proteinen mit CTD-Peptiden bekannt: die Struktur des Capping-Enzyms Cgt1 mit einem pSer5 Peptid (Fabrega et al., 2003), die Struktur der Prolyl-Isomerase Pin1 mit einem pSer2/pSer5 Peptid (Verdecia et al., 2000) und die Struktur der CTD-Interaktionsdomäne von Pcf11 mit einem pSer2 Peptid (Meinhart and

Cramer, 2004; Noble et al., 2005a). Jedes dieser Proteine erkennt einen anderen Phosphorylierungszustand der CTD und in jedem dieser CTD-Peptid/Protein Komplexe nimmt die CTD unterschiedliche Konformationen ein. Dagegen wurde erst vor kurzem für den RNA-Reifungsfaktor SCAF8 gezeigt, dass dieser promiskuitiv phosphorylierte CTD-Peptide bindet und dass diese Peptide unabhängig von ihrem Phosphorylierungszustand eine β -Faltblattstruktur annehmen (Becker et al., 2008).

2.6.2 Der Transkriptionszyklus

Die Synthese von RNA durch die RNA-Pol II setzt sich aus mehreren Phasen zusammen, die den sogenannten Transkriptionszyklus bilden. Pre-Initiation, Initiation, Promotorfreilassung, Elongation und Termination bilden die Hauptphasen dieses Zyklus (Sims et al., 2004). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation des Cdk-Cyc-Komplexes P-TEFb, der an der Regulation der Transkriptionselongation beteiligt ist. Deshalb wird im Folgenden der allgemeine Transkriptionszyklus nur kurz behandelt und der Schwerpunkt auf die Elongationsphase gelegt.

Die Transkription beginnt mit der Bildung eines Pre-Initiationskomplexes (*pre-initiation complex*, PIC) am Promotor. Als Promotor wird die minimale DNA-Sequenz definiert, die für eine basale Transkription notwendig ist (Hahn, 2004). Der PIC setzt sich aus den generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) und der RNA-Pol II zusammen, die Bindung dieser Faktoren erfolgt in einer definierten Reihenfolge um die RNA-Pol II korrekt am Promotor zu positionieren. Die CTD der Polymerase ist zu diesem Zeitpunkt nicht phosphoryliert, diese Form der Polymerase wird auch als RNA-Pol II A oder hypophosphorylierte Form bezeichnet (Lu et al., 1991). Obwohl alle Faktoren assembliert sind, befindet sich der PIC jedoch noch nicht in einer aktiven Konformation um mit der RNA-Synthese zu beginnen. Unter ATP-Hydrolyse kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der 11 bis 15 Basenpaare (bp) um die Transkriptionsstartstelle entwunden werden. Für das Aufwinden der DNA ist die XBP DNA-Helikase Untereinheit des GTF TFIIH verantwortlich. Diese neue Konformation, auch als offener PIC bezeichnet, erlaubt dem *Template*-Strang den Zugang zu der aktiven Stelle der RNA-Pol II, kurz darauf beginnt mit Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung die RNA-Synthese. Der Komplex, jetzt als initial transkribierender Komplex (*initially transcribing process*, ITC) bezeichnet, ist jedoch noch sehr instabil, was sich in einem Prozess äußert, der abortive Initiation genannt wird. RNA-Pol II synthetisiert dabei 2-3 nt lange Produkte, die jedoch entlassen werden. Ein anderer in dieser frühen Phase auftretender Vorgang ist das Transkript-Durchgleiten (*slippage*). Hierbei entpaart sich das RNA-Transkript von der DNA-Vorlage und rehybridisiert aufwärts, so dass längere RNA-Transkripte entstehen (Saunders et al., 2006).

Der Übergang in einen frühen Elongationskomplex (*early elongation complex*, EEC) erfolgt mit dem Anfügen des achten Nukleotids (Hieb et al., 2006). Mit einer Länge von 8 bis 9 bp hat das RNA-DNA Hybrid seine volle Länge erreicht und kann Kontakte mit bestimmten Proteinschleifen der Polymerase eingehen, was zu einer Stabilisierung des gesamten Komplexes führt (Westover et al., 2004). Der EEC ist durch ein vermindertes Auftreten des Transkript-*slippage* und dem Ende der Freilassung abortiver Transkripte charakterisiert. Ferner ist der EEC nicht mehr auf ATP und TFIIH angewiesen (Dvir, 2002). Mit dem Beginn

der RNA-Synthese geht ebenfalls die Phosphorylierung von Ser5 der CTD durch Cdk7 einher. Diese Modifikation ist für das *Capping* der RNA entscheidend (Kapitel 2.6.4.).

Bei einer RNA-Transkriptlänge von ungefähr 30 nt, bricht die Polymerase ihre Kontakte mit Promotor-Sequenzen und einigen promotor-gebundenen Faktoren vollständig ab. Bevor RNA Pol II jedoch die ganze Länge eines Gens transkribieren kann, kommt es häufig zu einem Halt der Polymerase in Promotornähe. Auf die Bedeutung dieses Transkriptionsarrestes, der eine zentrale Funktion bei dem Übergang in die produktive Elongation einnimmt, wird im nächsten Kapitel intensiver eingegangen. Nach der Promotorlösung der RNA-Pol II bleiben viele der GTF am Promotor gebunden. Diese Faktoren bilden ein Gerüst (*scaffold complex*), das eine schnelle Reinitiation der Transkription in den nächsten Runden vermitteln kann (Hahn, 2004; Yudkovsky et al., 2000).

Bei vielen Genen stoppt die RNA-Pol II kurz nach dem Übergang in den EEC ca. 25 bis 50 nt hinter der Transkriptionsstartstelle. Dieses Phänomen wurde zuerst bei den *Drosophila* Hitzeschockgenen und später bei einer Vielzahl anderer Gene, wie z.B. den Proto-Onkogenen *Myc* und *Fos* sowie der Transkription des HIV-Genoms beobachtet (Rougvie and Lis, 1988; Saunders et al., 2006). Neue genomweite Analysen deuten darauf hin, dass dieses Phänomen noch verbreiteter ist als bisher angenommen (Kim et al., 2005)

2.6.3 Transkriptionsarrest und Wirkung von P-TEFb

Verursacht wird der Transkriptionsarrest durch das gemeinsame Wirken von zwei N-TEF, dem DRB Sensitivität-induzierbaren Faktor (*DRB-sensitivity inducing factor*, DSIF) und dem Negativen Elongationsfaktor (*negative elongation factor*, NELF) (Wada et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999).

DSIF ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten der humanen Homologen der Hefepoteine Spt4 (14 kDa) und Spt5 (160 kDa). Beide Proteine werden ubiquitär in Eukaryoten exprimiert und sind hoch konserviert. Eine besondere Eigenschaft der hSpt5 Untereinheit sind eine stark acide N-terminale Region sowie zwei am C-Terminus vorkommende Wiederholungseinheiten, die CTR1 und CTR2 (*C-terminal repeat*) genannt werden. CTR1 besteht aus neun Wiederholungen der hoch konservierten Heptad-Sequenz GS(R/Q)TPXY und CTR2 aus zehn Wiederholungen der Sequenz P(T/S)PSP(Q/A)(S/G)Y (Stachora et al., 1997).

NELF dagegen ist ein aus den fünf Untereinheiten NELF-A, B, C/D und E bestehender 300 kDa Multiproteinkomplex, der zwar in Invertebraten und Insekten konserviert ist, in Hefe und Würmern jedoch nicht vorkommt (Peterlin and Price, 2006). Für die Inhibition der Elongation werden alle fünf Untereinheiten benötigt. NELF-A enthält ein RNA-Erkennungsmotiv und wird von dem Gen *WHSC2* codiert, das im Zusammenhang mit dem Wolf-Hirschhorn Syndrom steht (Wright et al., 1999). Dieses Syndrom ist eine seltene Erbkrankheit, die sich durch Minderwuchs und einer Verzögerung der geistigen und körperlichen Entwicklung auszeichnet. Für NELF-B konnte eine Interaktion mit dem Tumorsuppressor BRCA1 gezeigt werden (Ye et al., 2001). NELF-E besitzt ein N-terminales Leuzin-Zipper Motiv, eine zentrale Domäne mit Arg-Asp Wiederholungen (RD-Motiv) sowie ein C-terminales RNA Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM) (Narita et al., 2003).

Die Fähigkeit von NELF RNA zu binden, ist essentiell für die Aktivität dieses Faktors (Yamaguchi et al., 2002).

Der genaue Mechanismus, nach welchem DSIF und NELF den Arrest der RNA-Pol II herbeiführen, ist noch unklar. Bekannt ist, dass DSIF über seine Spt5 Untereinheit direkt mit der transkribierenden Polymerase interagiert (Ivanov et al., 2000). Diese Assoziation hat jedoch keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität der RNA-Pol II (Yamaguchi et al., 1999). NELF bindet anschließend an den RNA-Pol II-DSIF Komplex und die Formierung dieses trimären Komplexes geht mit der Inhibition der RNA-Pol II einher. NELF/DSIF üben ihre negative Wirkung an der Position der RNA-Pol II aus, an welcher das wachsende RNA-Transkript aus der RNA-Polymerase rausragt (Palangat et al., 2005). Basierend auf den bekannten Daten wurde ein möglicher Mechanismus vorgeschlagen, nach dem DSIF/NELF die Aktivität der Pol II durch Bindung des wachsenden RNA-Transkripts inhibieren könnte. Hierfür könnte das RRM von NELF-E verantwortlich sein.

P-TEFb stellt den bislang einzigen Faktor dar, der den RNA-Pol II Arrest aufheben und einen Übergang von einer abortiven in eine produktive Transkription bewirken kann. Hierfür wird die enzymatische Aktivität der Kinaseuntereinheit Cdk9 benötigt. P-TEFb phosphoryliert Ser2 der CTD und überführt diese in einen hyperphosphorylierten Zustand. Ferner werden Thr4 Reste in der CTR1 von Spt5 (Yamada et al., 2006) sowie Serine in NELF-E nahe des RRM phosphoryliert (Fujinaga et al., 2004). Diese Phosphorylierungen, zusammen mit einer Methylierung von Spt5 führen zu einer Dissoziation von NELF aus dem trimären Komplex. DSIF bleibt dagegen mit der RNA-Pol II assoziiert und agiert nun als ein positiver Elongationsfaktor. P-TEFb wirkt jedoch nicht nur den Effekten der N-TEFs entgegen, sondern ermöglicht durch die Phosphorylierung der CTD auch die Rekrutierung von RNA-modifizierenden Enzymen.

2.6.4 Kopplung von Transkription und mRNA Prozessierung

Die von der RNA-Pol II transkribierte mRNA wird vor dem Export in das Cytoplasma modifiziert. Zu diesen Modifikationen gehören u.a. das *Capping*, *Splicing* sowie die poly-Adenylierung der mRNA. Diese Prozessierungen finden noch während der Transkription, also co-transkriptional statt (Orphanides and Reinberg, 2002). Eine entscheidende Funktion nimmt hierbei die CTD durch Rekrutierung verschiedener RNA-Prozessierungsfaktoren ein (siehe Abbildung 8). Es wurde vorgeschlagen, dass die Rbp7 Untereinheit der RNA-Pol II, die eine Oligonukleotidbindungsdomäne enthält und nahe des CTD-Anfangs lokalisiert ist, die wachsende RNA direkt zu der CTD und den dort wartenden Enzymen rekrutiert (Saunders et al., 2006). So hilft die Phosphorylierung der CTD an Ser5 die Enzyme für das *Capping* der RNA zu rekrutieren und zu aktivieren. Auch die Spt5 Untereinheit von DSIF interagiert mit diesen Enzymen. Der durch die N-TEF hervorgerufene Transkriptionsarrest wird als eine Art Kontrollpunkt angesehen, der die Rekrutierung der *Capping*-Enzyme und das anschließende *Capping* ermöglicht (Sims et al., 2004; Zhou and Yik, 2006). Nach dem *Capping* erlaubt die Aktivität von P-TEFb den Übergang in die produktive Elongation. Durch die nun an Ser2 und Ser5 hyperphosphorylierte CTD werden weitere Chromatin-modifizierende Faktoren, RNA-Prozessierungsfaktoren und Elongationsfaktoren rekrutiert (Hahn, 2008). Unter anderem erkennen *Splicing*-Faktoren die Ser2/Ser5-phosphorylierte

CTD und die Inhibition von P-TEFb beeinträchtigt *Splicing* in höheren Eukaryoten (Egloff and Murphy, 2008).

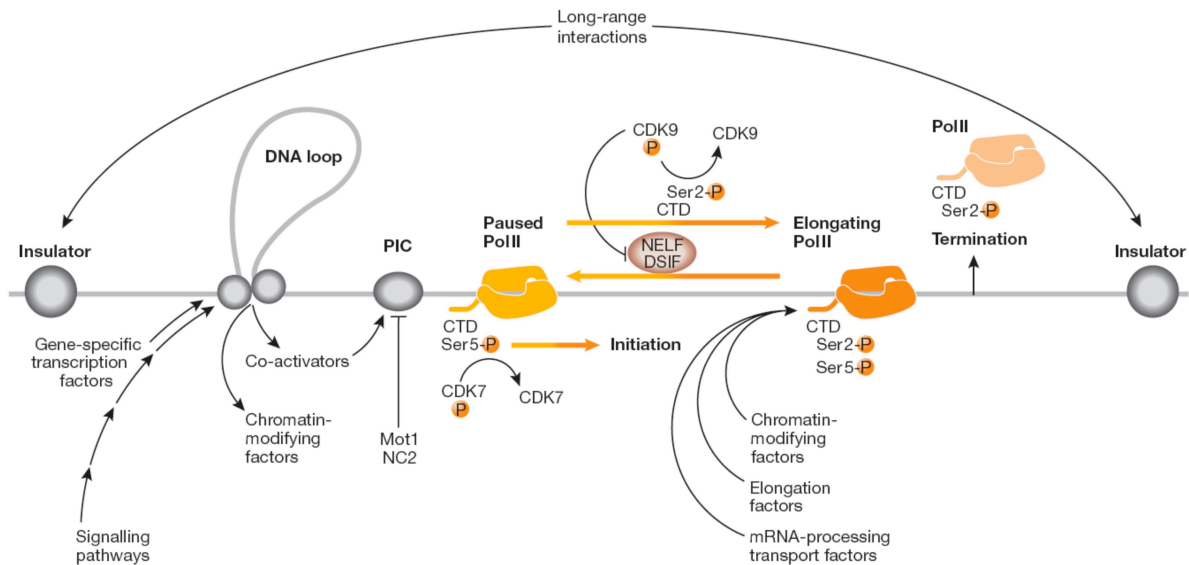


Abbildung 8: Phasen der RNA-Polymerase II Transkription. Gen-spezifische Transkriptionsfaktoren (TF) werden durch Signalwege aktiviert und binden an ihre entsprechenden DNA-Regionen. Durch Ausbildung einer DNA-Schleifenstruktur können auch weiter entfernte Faktoren mit proximalen Faktoren interagieren und an der Regulation der Transkription teilnehmen. Die Gen-spezifischen TF rekrutieren Co-Aktivatoren und Chromatin-modifizierende Enzyme und helfen hierdurch bei der Ausbildung des PIC. Zu Beginn der Initiation wird die CTD der RNA-Pol durch Cdk7 an Ser5 phosphoryliert. In höheren Eukaryoten wird kurz nach der Initiation häufig ein Arrest der Polymerase beobachtet, der auf die Wirkung von NELF und DSIF zurückzuführen ist. Dieser Arrest wird durch die Aktivität von P-TEFb aufgehoben, der NELF, DSIF und die CTD an Ser2 phosphoryliert. Die an Ser2 und Ser5 phosphorylierte CTD dient als eine Art Plattform für verschiedene Faktoren, z.B. für Chromatin-modifizierende Faktoren, Elongationsfaktoren, mRNA-Prozessierungsfaktoren sowie mRNA-Transport- und Terminationsfaktoren. Insulator-Elemente können durch *longe-range* Interaktionen miteinander interagieren und die Ausbildung von Chromatin-Domänen ermöglichen. So wird verhindert, dass regulatorische Signale auf benachbarte Gene übergehen. Aus: Hahn, 2008.

Die Elongationsphase der Transkription ist somit nicht nur für die Synthese von volle Längen RNA-Transkription essentiell, sondern ebenfalls für die Kopplung von Transkription und mRNA Prozessierung (Sims et al., 2004).

2.6.5 HIV-1 Transkriptionselongation

Viele Erkenntnisse über die Wirkung von P-TEFb sind auf Untersuchungen der HIV-1 Genexpression zurückzuführen, die ein Paradebeispiel für die Regulation der Transkription auf der Ebene der Elongation darstellt (Barboric and Peterlin, 2005). Das HI-Virus ist ein hoch pathogenes Lentivirus, welches das erworbene Immunschwäche Syndrom (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) auslöst (Jones and Peterlin, 1994). Lentiviren sind nicht nur ausschließlich auf die Wirtsmaschinerie angewiesen, sondern codieren zusätzlich für akzessorische und regulatorische Proteine, die für die Replikation des Virus essentiell sind. Diese nehmen eine Art Schalterfunktion zu verschiedenen Phasen des Replikationszyklus ein.

Eines dieser Proteine ist das Tat Protein (*transcriptional transactivator*), das als eines der ersten Proteine im viralen Replikationszyklus exprimiert wird. Tat agiert als Aktivator der HIV-1 Transkription und unterscheidet sich von anderen zellulären Aktivatoren dadurch, dass

seine Funktion die Anwesenheit eines RNA-Elements erfordert. Dieses RNA Element ist die TAR-RNA, eine stabile Haarnadelstruktur aus 59 nt, die sich am 5'-Ende aller viralen Transkripte ausbildet. Die humane TAR-RNA formt eine doppelsträngige Stammschleifen-Struktur mit einer 3 nt langen U-reichen Ausstülpung und einer aus 6 nt bestehenden apikalen Schleife (Jones and Peterlin, 1994). Kurz nach der Transkriptionsinitiation führen die N-TEF DSIF und NELF zu einem Arrest der RNA-Pol II an dieser Haarnadelstruktur. NELF bindet dabei über sein RRM-Motiv in NELF-E an die TAR-RNA (Yamaguchi et al., 2002). Ohne die Anwesenheit von Tat generiert die RNA-Pol II nur kurze RNA-Transkripte und kann nicht über die TAR-Struktur des HIV-LTR hinaus transkribieren. Seine Funktion als Transkriptionsaktivator übt Tat durch die Bindung an Cyclin T1 aus (Wei et al., 1998). Hierdurch wird P-TEFb an die TAR-RNA und die arretierte Polymerase rekrutiert. Dort phosphoryliert Cdk9 die RNA-Pol II CTD sowie NELF und DSIF und bewirkt so, wie bereits oben erwähnt, den Übergang in die produktive Elongation (Fujinaga et al., 2004).

In den ersten Runden der Virustranskription, wenn noch kein Tat gebildet worden ist, muss P-TEFb über einen anderen Mechanismus an das HIV-LTR rekrutiert werden (Abbildung 9). Diese Funktion wird von dem Transkriptionsaktivator NF- κ B ausgeführt, der zwei *Enhancer*-Elemente im 5'-LTR und P-TEFb bindet (Barboric et al., 2001). Nachdem ausreichend Tat vorhanden ist, überwiegt der Mechanismus der durch Tat aktivierten Transkription. Insgesamt wurden innerhalb der HIV-1 Tat-Sequenz fünf verschiedene Motive identifiziert. Vom N- zum C-Terminus des Proteins sind dies ein N-terminaler Bereich, ein Cystein-reicher Bereich, eine Kerndomäne, ein Arginin-reicher Bereich (*Arginine rich motif*, ARM) sowie ein C-terminaler Bereich (Jones and Peterlin, 1994). Die ersten drei Motive bilden das Aktivierungssegment des Proteins, das mit Cyclin T1 wechselwirkt. Für die Interaktion mit Tat ist ein Cystein-Rest (Cys261) im Tat-TAR Erkennungsmotiv (*Tat-TAR recognition motif*, TRM) von Cyclin T1 essentiell. Es wird angenommen, dass dieses Cystein einen intermolekularen Zinkfinger mit Tat ausbildet. Murines Cyclin T1, sowie Cyclin T2 und Cyclin K, die kein Cystein an dieser Position besitzen, sind nicht zur Tat-Transaktivierung befähigt (Garber et al., 1998; Wimmer et al., 1999).

Tat bindet über das ARM die U-reiche Ausstülpung der TAR-RNA. Die apikale Schleife der RNA interagiert dagegen mit dem aus basischen Aminosäuren bestehenden TRM von Cyclin T1. Cyclin-T1 kann jedoch ohne Tat nicht an die TAR-RNA binden. Ferner wurde berichtet, dass Cyclin T1 die Affinität zwischen Tat und TAR erhöht (Richter et al., 2002; Zhang et al., 2000). Die Struktur des humanen P-TEFb-Tat-TAR-Komplexes konnte bisher noch nicht gelöst werden. Jedoch liefert die erst vor kurzem veröffentlichte Struktur des Cyclin T1-Tat-TAR Komplexes mit homologen Proteinen und RNA aus dem Pferd erste Einblicke in Mechanismus der viralen Tat-Aktivierung (Anand et al., 2008). In dieser Struktur nimmt das ARM von Tat eine helikale Faltung an und bindet in die große Furche der RNA-Haarnadelschleife. Die Interaktion von Tat mit Cyclin T1 wird vor allem über eine zwischen den Helices vier und fünf liegende Schleife in der ersten Cyclin-Box vermittelt. Diese Schleife ist spezifisch für T-Typ Cycline (Anand et al., 2007). Die Aminosäuresequenz dieser Region unterscheidet sich jedoch in Cyclin T1 und Cyclin T2, dies erklärt, warum Tat nur Cyclin T1 bindet. Anhand der Struktur ist ersichtlich, warum eine Acetylierung von Tat an Lys50 zu einer Dissoziation von P-TEFb und der TAR-RNA führt, wie es von Kaehlcke beschrieben wurde (Kaehlcke et al., 2003). Diese Modifikation würde zu einer Aufhebung

elektrostatischer Interaktionen zwischen Lys50 und Phosphatgruppen der RNA führen und wäre sterisch ungünstig.

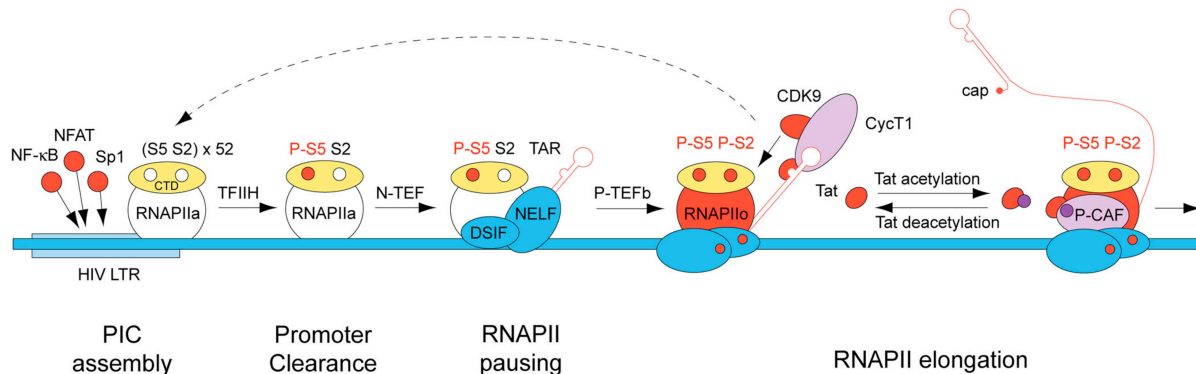


Abbildung 9: HIV-1 Transkriptionsaktivierung durch Tat. Zelluläre Aktivatoren, wie z.B. NF- κ B binden den HIV LTR-Promotor (hellblaues Rechteck) und rekrutieren die hypophosphorylierte RNAPII an die Startstelle der Transkription. Die CTD mit Ser2 und Ser5 wird hier als ein gelbes Oval mit zwei hellen Kreisen dargestellt. Durch die Helikaseaktivität von TFIIH wird die Promotorregion aufgeschmolzen, ferner phosphoryliert Cdk7 des TFIIH Ser5 der CTD. Dies führt zu einer Loslösung der Polymerase vom Promotor. Die Polymerase transkribiert nun die TAR-RNA und wird durch die NTEF DSIF und NELF in ihrer Bewegung gestoppt. Der Übergang in die Elongation und somit die Transkription des HIV-Genoms wird durch das virale Tat Protein ermöglicht, das P-TEFb an die TAR-RNA und die dort arretierte Polymerase rekrutiert. P-TEFb phosphoryliert DSIF, NELF und die CTD. Tat wird anschließend durch die Acetyltransferase p300 acetyliert (violetter Punkt) und dissoziiert von der TAR-RNA. Der Cofaktor P-CAF (p300/CREB-binding protein) bindet acetyliertes Tat und assoziiert mit der zur Elongation kompetenten RNA-Pol II, möglicherweise ist P-CAF für den Umbau von Chromatin verantwortlich. Aus: Barboric und Peterlin, 2005.

2.7 Regulation von P-TEFb

Ebenso wie andere Cdk-Cyc Paare ist auch P-TEFb einer strengen Regulation unterlegen. Untersuchungen in HeLa-Zellen haben ergeben, dass rund 50% des in der Zelle vorhandenen P-TEFb in einem katalytisch inaktiven Komplex vorliegen.

Als erster Bestandteil des inaktiven Komplexes wurde 2001 die in Vertebraten hoch konservierte 7SK snRNA (*small nuclear RNA*, snRNA) entdeckt (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001). Erst zwei Jahre später wurde mit dem Hexamethylen-Bisacetamid induzierbaren Protein Hexim ein weiterer Bestandteil des inaktiven Komplexes gefunden. Hexim inhibiert in Abhängigkeit von der 7SK snRNA die Kinaseaktivität von Cdk9 nach einem bisher ungeklärten Mechanismus (Michels et al., 2003; Yik et al., 2003). Der 7SK snRNA wird dabei eine Gerüstfunktion zugeschrieben, die die Interaktion von Hexim und P-TEFb stabilisiert (Egloff et al., 2006). Die Formierung des inaktiven Komplexes aus P-TEFb und Hexim-7SK snRNA erfordert die Phosphorylierung von Cdk9 an Thr186 (Chen et al., 2004). Ein weiterer fest assoziierter Bestandteil dieses inaktiven Komplexes ist das erst kürzlich identifizierte Protein Larp7 (*La-related protein 7*). Larp7 bindet spezifisch an den hoch konservierten 3'-U-reichen Bereich der 7SK RNA und schützt diese vor dem Abbau durch 3'-Exonukleasen (He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008).

Die aktive Form von P-TEFb ist mit dem Bromodomänen-enthaltenden Protein Brd4 assoziiert. Brd4 gehört der konservierten BET-Proteinfamilie an, deren Mitglieder zwei Bromodomänen (BDI und BDII) sowie eine extra-terminale (ET) Domäne aufweisen (Florence and Faller, 2001). Bromodomänen sind Motive aus ca. 110 Aminosäuren, die

spezifisch acetylierte Lysine in Histonen erkennen. Für die Bromodomänen von Brd4 konnte eine Interaktion mit acetylierten Lysinen der Histone H3 und H4 nachgewiesen werden, die ein Kennzeichen für aktiv transkribierte Gene darstellen (Dey et al., 2003). Ferner bindet Brd4 den Mediator-Komplex (Wu and Chiang, 2007). Über diese beschriebenen Interaktionen ermöglicht Brd4 die Rekrutierung von P-TEFb an die Promotorregion. Abbildung 10 zeigt schematisch die gerade beschriebenen P-TEFb Komplexe während des Arrestzustandes und der Elongationsphase der Transkription.

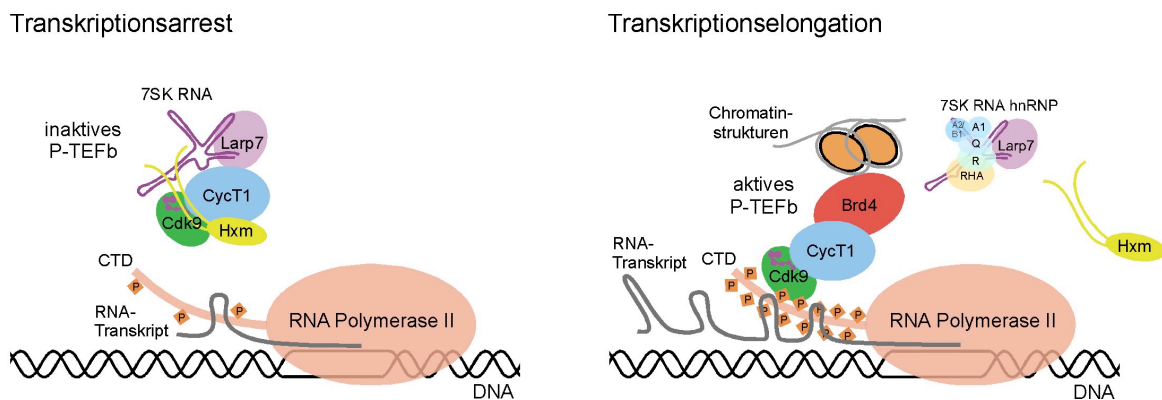


Abbildung 10: Schematische Darstellung des inaktiven und aktiven P-TEFb Komplexes. Zu Beginn der Transkription ist die CTD der RNA-Pol II hypophosphoryliert und P-TEFb liegt in einem inaktiven Komplex vor, der neben Hexim1/2 die kleine nukleäre 7SK RNA beinhaltet. Larp7 bindet an das 3'-poly(U)-Ende der RNA und schützt diese vor Degradation. Der Übergang in den aktiven Elongationskomplex ist mit der Dissoziation von Hexim1 und der 7SK RNA und Assoziation an das Bromodomänen-enhaltende Protein Brd4 verbunden, welches P-TEFb an Promotorregionen aktiv transkribierter Gene rekrutiert. Dort phosphoryliert Cdk9 die CTD und überführt diese in einen hyperphosphorylierten Zustand. Nach dem Entlassen aus dem inhibierten Komplex assoziiert die 7SK RNA mit der RNA Helikase A (RHA) und den heterogenen Ribonuklearproteinen (hnRNP) A1, A2/B1, R und Q.

Ein schneller Übergang von dem inaktiven 7SK snRNP Komplex in den aktiven Brd4-gebundenen Komplex wird bei der Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht oder der Behandlung mit Stress-induzierenden Substanzen beobachtet. Zu letzterem gehören Kinaseinhibitoren wie z.B. Flavopiridol und DRB oder DNA-interkalierende Agenzien wie Actinomycin D (Zhou and Yik, 2006) Die molekularen Mechanismen, die zur Dissoziation der RNA und Hexim führen, sind bisher noch ungeklärt. Die freie 7SK snRNA wird nach Dissoziation aus dem großen Komplex nicht abgebaut, sondern assoziiert mit einer Reihe von heterogenen nukleären Ribonuklearproteinen (*heterogeneous nuclear ribonuclear protein*, hnRNP) sowie mit der RNA-Helikase A (Barrandon et al., 2007; Van Herreweghe et al., 2007).

2.7.1 Die 7SK snRNA

Die 7SK RNA ist mit einem Gehalt von 2×10^5 Kopien/Zelle eine der am häufigsten vorkommenden nicht-codierenden RNAs in Vertebraten. Sie wird von der RNA-Polymerase III transkribiert und besitzt eine Länge von 332 nt (Wassarman and Steitz, 1991). Posttranskriptional wird die 7SK RNA am γ -Phosphat des 5'-Guanosins mit einer Methylgruppe modifiziert (Gupta et al., 1990). Verantwortlich für diese Modifizierung ist das erst kürzlich in einem proteomischen Screen identifizierte Protein MEPCE (*methyl phosphate capping enzyme*), das zunächst als BCDIN3, einem Ortholog des Drosophila Bin3 Proteins

(*bicoid interacting protein*) entdeckt und später unbenannt wurde. Sowohl MEPCE als auch Larp7 sollen konstant mit der 7SK RNA assoziiert bleiben (Jeronimo et al., 2007).

Obwohl schon seit den 70 Jahren bekannt (Wassarman and Steitz, 1991), blieb die Funktion der 7SK RNA zunächst unklar bis ihr zusammen mit Hexim eine Rolle als negativer Regulator der P-TEFb Aktivität zugeschrieben wurde. Die 7SK RNA kann jedoch die Kinaseaktivität nicht alleine inhibieren. Als möglicher Mechanismus wird angenommen, dass die RNA einen auto-inhibierten Zustand von Hexim aufhebt und die Bindung von Hexim an P-TEFb vermittelt (siehe unten).

Basierend auf biochemische Untersuchungen wurde schon 1991 eine Sekundärstruktur der 7SK RNA vorgeschlagen, die vier Haarnadelschleifen (I-IV) aufweist (Wassarman and Steitz, 1991). Die Sequenz der 5'- und 3'-terminalen Haarnadelschleifen ist zwischen verschiedenen Spezies am stärksten konserviert (Gruber et al., 2008). Ein minimales RNA-Konstrukt aus diesen beiden Sekundärstrukturelementen ist funktionell ausreichend, wobei die Bindung von Hexim über den 5'-loop (Nukleotide G24-C48/G60-C87) vermittelt wird (Egloff et al., 2006). In derselben Studie wurde gezeigt, dass P-TEFb in Anwesenheit von Hexim die 3'-terminale Haarnadelschleife (nt 302-324) bindet, die eine hohe Ähnlichkeit mit der HIV-1 TAR-RNA aufweist. Dies deutet darauf hin, dass die Formierung des 7SK snRNP Komplexes kooperative Wechselwirkungen zwischen Hexim, P-TEFb und 7SK RNA beinhaltet (Zhou and Yik, 2006). Alternative Daten existieren, wonach ein RNA-Konstrukt bestehend aus den nt 24-48 ausreichend für die Hexim-Bindung ist (Li et al., 2007).

2.7.2 Hexim als Inhibitor der Kinaseaktivität von P-TEFb

Hexim ist zunächst als ein nukleäres Protein identifiziert worden, dessen Expression in Hexamethylen-Bisacetamid (HMBA) behandelten vaskulären weichen Muskelzellen induziert wurde (Kusuhara et al., 1999) (Ouchida et al., 2003). HMBA ist als Reagenz bekannt, welches das Wachstum von Zellen unterbindet und die Differenzierung dieser einleitet. Als Bestandteil des quartären inaktiven P-TEFb Komplexes wurde Hexim zunächst als MAQ1 (*Menage à quatre*) bezeichnet (Michels et al., 2003).

Das Hexim-Gen ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert und codiert für ein 359 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa (Ouchida et al., 2003). Die Primärsequenz dieses Proteins lässt sich in vier Regionen unterteilen: einen N-terminalen Prolin-reichen Bereich (1-149), für den eine selbst-inhibitorische Funktion vermutet wird, einer zentralen basischen Region (150-177), einer hoch konservierten Region (185-220) mit einem negativen Ladungscluster, sowie einem C-terminalen Bereich, der als Bindungsdomäne für Cyclin T (*T binding domain*, TBD) identifiziert wurde (Schulte et al., 2005). Die dreidimensionale Struktur der Cyclin T Bindungsdomäne konnte mittels NMR-Spektroskopie gelöst werden. Die TBD formt ein paralleles, homodimeres *coiled-coil*. Dieses *coiled-coil* ist aus zwei ungefähr gleichlangen Segmenten, bestehend aus den Helices ($\alpha 2/\alpha 2'$) und ($\alpha 3/\alpha 3'$), aufgebaut. Eine kurze α -Helix ($\alpha 1$), die mit dem ersten Segment der gegenüberliegenden Helix ($\alpha 2'$) wechselwirkt, befindet sich N-Terminal der *coiled-coil* Region (Dames et al., 2007). Die Bindung an die Cyclin-Boxen ist eine elektrostatisch getriebene Interaktion, die einen negativ geladenen Bereich auf dem ersten *coiled-coil* Segment von Hexim und positive Ladungen im C-terminalen Bereich der Cyclin T1-Cyclin-

Box einschließt. Die Dissoziationskonstante der Bindung wurde zu $3,4 \mu\text{M}$ bestimmt (Dames et al., 2007). Im Gegensatz zu der TBD, die eine hochpolare Struktur aufweist, scheinen nach Sekundärstrukturvorhersagen die ersten drei Bereiche des Proteins unstrukturiert zu sein. Ein helikaler Anteil wird lediglich für die Region (170-195) vorhergesagt (Schulte et al., 2005). Der zentrale Bereich (155-177) ist sowohl für die nukleäre Lokalisation des Proteins als auch für die Bindung an die 7SK RNA essentiell. Diese Region enthält zwei basische Bereiche, von denen Teile des ersten Bereichs starke Ähnlichkeit zu dem ARM von Tat aufweisen (Yik et al., 2004). Die Bindung an die 7SK RNA erfordert ein intaktes KHRR-Motiv (152-155). Es wird vermutet, dass der basische Bereich in Abwesenheit von RNA mit einer benachbarten weiter C-terminalen Region negativer Ladung wechselwirkt und diese Interaktion in eine autoinhibierte Konformation resultiert, die durch Bindung von RNA aufgehoben werden kann (Barboric et al., 2005). Hexim bindet neben der 7SK RNA, sequenzunabhängig doppelsträngige RNA sowie die mir-16 RNA (*micro RNA*) (Li et al., 2007). Vollängen Hexim kann nur in Anwesenheit der 7SK RNA P-TEFb binden und die Kinaseaktivität inhibieren (Michels et al., 2004). Die hoch-konservierte Region beinhaltet das sogenannte PYNT-Motiv (aa 202-205). Mutationen dieses Motivs heben die Interaktion zwischen Hexim und P-TEFb und somit die Inhibitionseigenschaften von Hexim auf (Michels et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass Hexim-Mutanten an Phe208 oder Tyr271 nicht mehr zur Inhibition von Cdk9 befähigt sind, obwohl die Bindung des quartären Komplexes nicht beeinträchtigt ist (Li et al., 2005).

Vor kurzem wurde ein kleineres Homolog von Hexim identifiziert und als Hexim2 bezeichnet (Byers et al., 2005; Yik et al., 2005). Beide Proteine werden von unterschiedlichen Genen, die sich auf demselben Locus befinden, codiert. Hexim1 und Hexim2 weisen ab dem zentralen Bereich (aa 150 für Hxm1) über 50% Sequenzidentität auf, unterscheiden sich aber stark in ihren N-terminalen Bereichen, wie die schematische Domänenarchitektur der beiden Proteine in der folgenden Abbildung zeigt.

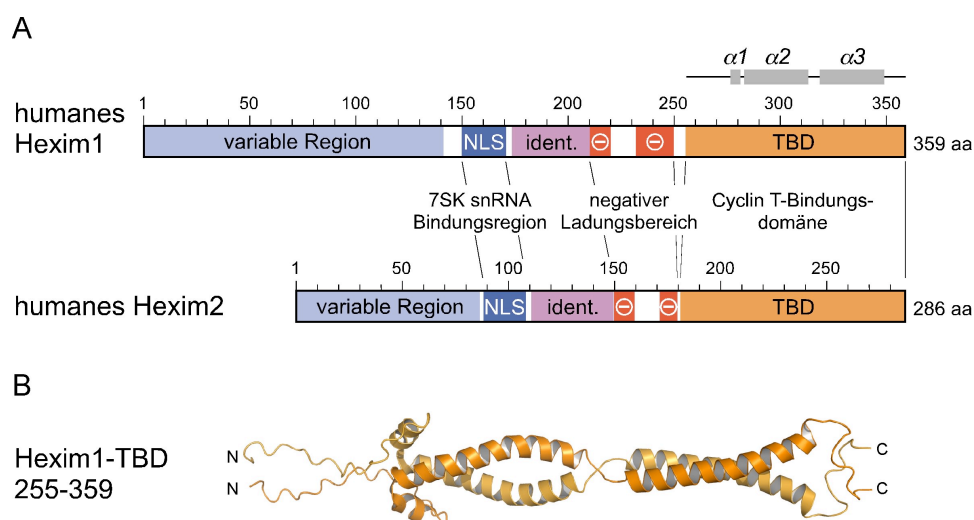


Abbildung 11: A. Schematische Darstellung der Domänenarchitektur von Hexim1 und Hexim2. Am N-Terminus befindet sich eine variable Region. Es folgt ein zentrales nukleäres Importsignal (*nuclear localisation signal*, NLS), das gleichzeitig die Bindungsregion für die 7SK snRNA darstellt. Daran schließt sich eine Region hoher Homologie und zwei Bereiche negativer Ladung an. Am C-Terminus liegt die Cyclin T-Bindungsdomäne (*Cyclin T binding domain*, TBD), die ein homodimeres *coiled-coil* aus drei α -helikalen Abschnitten bildet. B. NMR-Struktur der TBD von humanen Hexim1 (PDB: 2GD7).

Ebenso wie Hexim1 kann Hexim2 stabile Homo-Dimere und einen inaktiven Komplex mit der 7SK RNA und P-TEFb ausbilden. Auch die Formierung von Hetero-Dimeren aus Hexim1 und Hexim2 wurde beobachtet (Dulac et al., 2005; Yik et al., 2005). In HeLa-Zellen ist das Expressionsniveau von Hexim1 vierfach gegenüber dem von Hexim2 erhöht. Nach einem *knock-down* von Hexim1 mit siRNA, kann Hexim2 jedoch den Verlust von Hexim1 kompensieren und so das Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven P-TEFb aufrechterhalten. Auffällig ist das mRNA-Expressionsmuster der beiden Proteine in unterschiedlichen humanen Gewebetypen. Während Hexim1 relative gleiche Expressionsniveaus zeigt, wird eine erhöhte Hexim2 mRNA-Expression vor allem im Eierstock und in Hoden beobachtet (Yik et al., 2005).

Zusätzlich zu der Funktion als Regulator von P-TEFb wurde Hexim als ein Inhibitor des Brustzell-Wachstums identifiziert, dessen Expression durch Östrogen herunter reguliert wird (*estrogen down-regulated gene 1*, EDG1) (Wittmann et al., 2003). Gewebe von Brusttumoren weist ein signifikant verringertes Expressionsniveau von Hexim gegenüber gesundem Brustzellgewebe auf. Hexim1 interagiert dabei direkt mit dem Östrogenrezeptor α und inhibiert die Transkriptionsaktivität dieses Rezeptors (Wittmann et al., 2005). Ferner bindet Hexim den Glucocorticoidrezeptor und reguliert dessen Aktivität (Shimizu et al., 2005). Eine Dysregulation von P-TEFb wurde ebenfalls in dem Krankheitsbild der kardiären Hypertrophie beschrieben (Sano et al., 2002). Diese Krankheit zeichnet sich durch eine Vergrößerung von Herzmuskelzellen aus und ist charakterisiert durch eine unkontrollierte Zunahme des mRNA- und Proteingehalts in der Zelle, hervorgerufen durch eine erhöhte Aktivität von P-TEFb (Wang and Fischer, 2008). *Knockout* des Maus-Homologs von Hexim1, CLP-1 (*cardiac lineage protein-1*) führt zum Tod noch während der fötalen Entwicklung (Huang et al., 2004). Erhöhte Proteingehalte von Hexim1 werden dagegen während der Differenzierung von Neuroblastomazellen beobachtet (Turano et al., 2006). Neben Hexim wurden in *C.elegans* und *Drosophila* zwei weitere Inhibitoren von P-TEFb beschrieben. In *Drosophila* interagiert das Pgc (*polar granule component*) Protein mit P-TEFb und verhindert die Rekrutierung von P-TEFb zu aktiven Promotorregionen in primordialen Keimzellen (Hanyu-Nakamura et al., 2008). PIE-1 (*pharynx and intestine in excess protein 1*) agiert in embryonalen Keimzellen von *C.elegans* als globaler Transkriptioninhibitor (Seydoux et al., 1996). In seiner Sequenz (aa 285-291) besitzt es eine CTD-ähnliche Heptadsequenz, die essentiell für die Repressorfunktion von PIE-1 gegenüber P-TEFb ist. Diese Heptadsequenz enthält Alanine anstelle der Serine an Position 2 und 5 (Batchelder et al., 1999; Ghosh and Seydoux, 2008). Der genaue Wirk-Mechanismus von Pgc und PIE-1 ist jedoch noch unklar.

2.8 Zielsetzung

Die Aktivität von P-TEFb wird durch die Assoziation mit positiven und negativen Faktoren streng reguliert. Eine Verschiebung dieses funktionalen Gleichgewichtes kann schwerwiegende Folgen haben und wird wie einleitend beschrieben im Krankheitsbild der kardären Herzmuskelhypertrophie oder auch bei der Entstehung von Brustkrebs beobachtet. P-TEFb besteht aus Cdk9 und Cyclin T1/T2 und liegt *in vivo* zu 50% mit Hexim und der 7SK snRNA in einem inaktiven Komplex vor, der Gegenstand dieser Arbeit ist.

Aufgrund des Vorkommens zweier Hexim als auch mehrerer Cdk9 assoziierter Cyclin Proteine können verschiedene inhibierte Komplexe gebildet werden. Es stellt sich daher die Frage nach einer möglichen Spezifität der Komplexformierung. Über das später entdeckte Hexim2 Protein sind allerdings bisher nur wenige biochemische Daten bekannt. Daher sollte zunächst die Cyclin T-Bindungsdomäne von Hexim2 eingegrenzt und biochemisch charakterisiert werden. Durch Interaktionsstudien zwischen den Hexim-Homologen und den Cyclin-Boxen von Cyclin T1 und Cyclin T2 sollen nähere Hinweise auf die Spezifität der Bindung erhalten werden. Ferner ist von Interesse, welche Region der 7SK RNA für die Bindung der Hexim-Homologe verantwortlich ist, und ob sich die Hexim Proteine in ihrer Eigenschaft die 7SK RNA zu binden, unterscheiden.

Der Mechanismus der Inhibition von P-TEFb durch Hexim ist bisher noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Aufklärung des Inhibitionsmechanismus geleistet werden. Um zu untersuchen, welche Bereiche des Hexim Proteins für die Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 essentiell sind, sollen verschiedene N- und C-terminal verkürzte Hexim Proteine auf ihre inhibitorischen Eigenschaften hin untersucht werden. Zu diesem Zweck müssen aktives P-TEFb sowie Substrate der Kinase rekombinant hergestellt und ein funktionaler Kinaseassay aufgebaut werden. Als Kinasesubstrate sollen CTD-Proteine mit einer unterschiedlichen Anzahl an CTD-Heptadwiederholungen generiert werden. Mit Hilfe dieser Analysen soll ein minimales, inhibierendes Hexim identifiziert werden, das im Komplex mit P-TEFb für kristallographische Studien eingesetzt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien der folgenden Firmen verwendet: AppliChem (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu (Gaiberg), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), GE-Healthcare (Freiburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Karlsruhe
Ultrafiltrationseinheiten	Millipore Amicon, Witten
Whatman P81 Zellulosepapier	Omnilab, Bremen
Zellkulturschalen	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

3.1.3 Chromatographiematerialien

Säulenmaterialien	
GSH 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden
Säulen	
Biosep-SEC-S4000	Phenomenex, Aschaffenburg
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
PD10 Entsalzungssäulen	GE Healthcare, Freiburg
Prontosil 120-5-C18-AQ	Bischoff Chromatographie, Leonberg

3.1.4 Nukleotide

ATP, 100 mM Stammlösung	GE Healthcare, Freiburg
[γ - ³² P]-ATP, 5 μ Ci/ μ l, 3000 mCi/mmol	Perkin Elmer, Boston, MA, USA

3.1.5 Reagenziensätze

QIAprep Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

3.1.6 DNA-Konstrukte

1 kb DNA-Leiter Primer	Invitrogen, Karlsruhe MWG Biotech, München
Vektoren	
pGEX-4T1 TEV-side modifiziert	GE Healthcare, Freiburg
pGEX-2T TEV-side modifiziert	GE Healthcare, Freiburg
pProEx-HTa, -HTb	Invitrogen, Karlsruhe
pET28a	Novagen, Darmstadt
pFastBac Dual	Invitrogen, Karlsruhe
pFastBac HT B	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Enzyme und Proteine

Enzyme	
Expand High Fidelity PCR System Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
TEV-Protease	MPI Dortmund
Trypsin, <i>proteomics grade</i>	Roche, Mannheim
Peptide	
PTSPSYSPTSPS-Amid × TFA	Biosyntan, Berlin
PT-pSer-PSYSPT-pSer-PS-Amid × TFA	Biosyntan, Berlin

Proteinstandards

Proteinstandard für SDS-PAGE (GE Healthcare, Freiburg)

97000 Da (Phosphorylase b), 66000 Da (Albumin), 45000 Da (Ovalbumin), 30000 Da (Carbonische Anhydrase), 20100 Da (Trypsininhibitor), 14000 Da (α -Lactalbumin)

Proteinstandard für die Größenausschlusschromatographie (Bio-Rad, München)

670000 Da (Thyroglobulin), 158000 Da (bovines Gamma-Globulin), 44000 Da (Hühner-Ovalbumin), 17000 Da (Pferde-Myoglobulin), 1350 Da (Vitamin B12)

3.1.8 Bakterienstämme und Zelllinien

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp
TG1	lac-pro thi-1 hsd Δ 5 [F' tra Δ 36, proAB+, lacIQ, lacZ.M15]
BL21(DE3)	F- ompT hsdS (r _B -m _B ⁻) dcm gal (DE3)
BL21(DE3)RIL	F- ompT hsdS(r _B -m _B ⁻) dcm Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]
BL21(DE3)RP	F- ompT hsdS(r _B -m _B ⁻) dcm Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam ^r]
DH10Bac	FmcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG/bMON14272/ pMON714
Insektenzelllinie	
Sf21 Zellen	Zelllinie aus dem Eierstockgewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Vaughn et al., 1977)

3.1.9 Laborgeräte

Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Brutschrank Heraeus CO ₂ Auto zero	Heraeus, Hanau
ESI-Massenspektrometer:	
LCQ Finnigan advantage MAX mit	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Agilent 1100 HPLC-System	Agilent, Santa Clara, CA, USA
FluoroMax-3 Spectrofluorometer	Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA
FPLC Äkta prime	GE Healthcare, Freiburg
Gefriergerät (-80°C) Heraeus Herafreeze	Heraeus, Hanau
Heizschüttler eppendorf Thermomixer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
HPLC-System:	
Waters 600 S Controller	Waters, Milford, MA, USA
Waters 626 Pumpe, Waters 2487 Dual	
λ Absorptionsdetektor, Waters 717plus	
Autosampler und Inline Entgaser AF	
Kühlzentrifuge eppendorf 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Schwabach
Microfluidizer M-110S	Microfluidics Corp., Newton, UK
Mikrokalorimeter VP-ITC und iTC ₂₀₀	Microcal, Northampton, UK
NMR-Spektrometer Varian Inova 600	Varian Inc., USA
Spektrometer (NMR)	
PCR-Maschine PCR-Sprint	ThermoHybaid, Ulm
Photometer eppendorf Biophotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Schüttelinkubator	Brunswick, Nürtingen
SDS-PAGE Gelkammer Mini-Protean III	Bio-Rad, München
Stopped-Flow SX20	Applied Photophysics, Surrey, UK
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103H	Bandelin electronic, Berlin
Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250	Branson, Danbury, CT, USA
Vortexer Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Bruchsal
Voyager-DE pro MALDI	Perseptive Biosystems, Weiterstadt
Massenspektrometer	
Waage Sartorius BP110S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge J2-HS	Beckmann, Fullerton, CA, USA

3.1.10 Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie

Medium und Zusätze für die eukaryotische Zellkultur

Fötales Kälberserum	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin Lösung 100 ×	Sigma, Steinheim
Pluronic F-68	Pan-Biotech, Aidenbach
TC100 Insekten Medium ohne Glutamin, ohne NaHCO ₃	Pan-Biotech, Aidenbach

LB-Differenzierungs-Agar-Platten

LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetrazyklin, 100 µg/ml X-Gal, 40 µg/ml IPTG

Minimalmedium zur heteronuklearen Markierung von Proteinen, Angaben pro Liter

7,5 g Na₂HPO₄ • 2 H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 0,25 g MgSO₄ • 7 H₂O, 0,014 g CaCl₂ • 2 H₂O, 1 g ¹⁵NH₄Cl, 10 g Glukose

Spurenelementlösung

2,5 g/l Borsäure, 2,0 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1,1 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 9,8 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,9 g/l $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Zink-EDTA Lösung

5 mg/ml EDTA, 8,4 mg/ml $\text{Zn}(\text{Ac})_2$

Antibiotika

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

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur *in-vitro* Vervielfältigung eines zwischen zwei Oligonukleotiden liegenden DNA-Abschnittes. Sie besteht aus einer Abfolge von Zyklen, wobei jeder Zyklus drei Reaktionsschritte beinhaltet. Im ersten Reaktionsschritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in die Einzelstränge denaturiert. Es folgt die Anlagerung der komplementären Primer an die DNA-Matrize (*annealing*) und anschließend die Verlängerung der Primer vom freien 3'-Hydroxyende aus (*extension*). Für die Einführung von Punktmutationen wurde die Mega-Primer-Methode verwendet. Bei dieser Methode werden zunächst in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen die Megaprimer generiert. In einem PCR Ansatz wird dabei der Bereich bis zur Punktmutation amplifiziert, in einem anderen Ansatz der Bereich von der Punktmutation bis zum Ende der DNA-Matrize. Der *reverse*-Primer des ersten sowie der *forward*-Primer des zweiten Ansatzes enthalten dabei die mutierte Basensequenz und überlappen typischerweise 15 bis 20 nt mit dem Gegenstrang. In einer zweiten PCR Runde werden die Megaprimer zusammengefügt, diese hybridisieren über den Bereich der Punktmutation. Mit den flankierenden Primern wird nun das Gesamtfragment amplifiziert.

Tabelle 1: Pipettierschema für einen PCR-Ansatz

	Konzentration	Volumen (μl)
DNA-Matrize	100 ng/ μl	1
dNTP	2,5 mM	4
Primer (<i>sense</i>)	10 pmol/ μl	1
Primer (<i>antisense</i>)	10 pmol/ μl	1
Polymerasepuffer	10x	5
Polymerase	5000 U/ml	0,5
ddH ₂ O		37,5

Die Denaturierung der DNA-Stränge erfolgte initial für 2 min bei 96°C und in den folgenden PCR-Zyklen für 15 s bei 94°C. Es folgte die Hybridisierung der Primer an die DNA für 30s bei 50-60°C und die Primerverlängerung für 45-60 s bei 72°C.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Fragmente können mittels der Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe getrennt werden. Nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurde die Agarosegelelektrophorese zur Trennung von anderen DNA-Fragmenten eingesetzt, nach einem Restriktionsverdau eines Plasmides diente sie der Klonierungskontrolle. In Abhängigkeit der Größe der zu isolierenden bzw. analysierenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele verschiedener Porengröße eingesetzt, was durch Variation der Agarosekonzentrationen von 0.8%-1.5% (w/v) erreicht wurde. Die entsprechende Agarosemenge wurde in TBE mit 0,006% (w/v) Ethidiumbromid durch Aufkochen gelöst und in die Gelkammer gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das polymerisierte Gel mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen wurde ebenfalls ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen (1kb DNA-Leiter, Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelsystemen der Firma Bio-Rad bei einer konstanten Spannung von 110 V, als Laufpuffer diente ebenfalls TBE mit 0,006% (w/v) Ethidiumbromid. Das sowohl im Gel als auch im Laufpuffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht diese im UV-Licht sichtbar.

TBE-Puffer	6x Probenpuffer
89 mM Tris pH 8,9	10% (w/v) Ficoll
89 mM Borsäure	0,025% (w/v) Bromphenolblau
0,9 mM EDTA	0,025% (w/v) Xylencyanol in TBE-Puffer

3.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Unter Hochsalzbedingungen binden die Nukleinsäuren an die in den Säulen vorhandene Silikamembran. Nach zwei Waschschrritten erfolgte die Elution der Nukleinsäure in Wasser oder Tris-Puffer. Das Elutionsvolumen betrug im Falle eines folgenden Restriktionsverdaus 32 µl bzw. 50 µl nach erfolgtem Verdau.

3.2.4 Restriktionsverdau

Zur Ligation zweier DNA-Fragmente müssen diese zunächst mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut werden. Diese Enzyme binden und spalten doppelsträngige DNA an den für sie spezifischen, meist palindromischen Sequenzen. Der Verdau wurde ebenfalls zu analytischen Zwecken eingesetzt, d.h. zur Klonierungskontrolle. Bei der Durchführung wurden die vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen eingestellt.

3.2.5 Ligation

Zwei mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnittene DNA-Fragmente können mit Hilfe des Enzyms Ligase kovalent verknüpft werden. Das Enzym katalysiert die Reaktion eines freien 3'-Hydroxyendes mit einem 5'-Phosphatende. Für die Ligation eines verdauten PCR-Fragments mit einem linearisierten Vektor wurde ein 20 µl Reaktionsansatz verwendet. Dieser Ansatz enthält 2 µl 10x Ligationspuffer, 1 µl linearisierten Vektor, 8 µl verdautes PCR-Fragment, 1 µl T4-DNA-Ligase und 8 µl H₂O. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 3 h.

3.2.6 Transformation von Bakterien

Die Aufnahme von Plasmiden in kompetente *E.coli* Zellen zur Vervielfältigung oder Expression der codierten Information wird als Transformation bezeichnet. Diese kann durch einen Hitzebehandlung oder einem Elektroschock der Zellen erfolgen.

Transformation durch Hitzeschock

Zur Transformation wurde eine Suspension der kompetenten Bakterien (~100 µl) langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl Miniprep-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 42 sek bei 42°C. Die Zellen wurden 2 min auf Eis inkubiert, auf LB-Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation durch Elektroschock

Nach Auftauen der Suspensionskultur elektrokompetenter Zellen wurde diesen 1 µl Miniprep-DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde 1 min auf Eis inkubiert, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes einem kurzen Spannungspuls von 1,5 kV (25 µF) unterzogen. Die Zellen wurden sofort mit 1 ml LB-Medium versetzt und 45 min bei 37°C geschüttelt, bevor sie auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach Vervielfältigung in TG1-Zellen unter Verwendung des QIASpin Plasmid Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die Bakterien wurden hierbei zunächst nach dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart von SDS aufgeschlossen. Das Lysat wurde neutralisiert und chromosomale DNA, Proteine, Lipide sowie SDS durch Hochsalzbedingungen präzipitiert. Durch Zentrifugation wurde das Präzipitat pelletiert und das Lysat anschließend auf eine Silicamembran gegeben. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution des Plasmids in H₂O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) und die Lagerung der DNA bei -20°C.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger mit fluoreszenzmarkierten Didesoxyoligonukleotiden. Es wurde der *Big-Dye Terminator Sequencing Kit* und ein ABI Prism 373XL Gerät (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Der Sequenzierungsansatz von 20 µl setzt sich aus 150-300 ng Plasmid-DNA, 2 µl 10x Sequenzierungspuffer, 4 µl *Terminator Mix*, 3,2 pmol Primer und 10 µl H₂O zusammen. In der PCR Reaktion wurden 25 Zyklen des folgenden Programms durchlaufen: Denaturierung der DNA bei 96°C für 10 s, Hybridisierung der Oligonukleotide mit der DNA-Vorlage bei 55°C für 5 s und anschließende Primerverlängerung bei 60°C für 4 min. Nach der PCR wurde die DNA mit Ethanol (abs.) gefällt, einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Proben wurden in der zentralen Einrichtung für Biotechnologie am Max-Planck-Institut Dortmund sequenziert.

3.2.9 Glycerindauerkulturen

Zur Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden 1200 µl einer Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ = 0,5-0,8 mit 800 µl sterilem 50% (v/v) Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinexpression in *E.coli*

Für die Expression wurden BL21(DE3) Zellen bzw. BL21(DE3)RIL Zellen eingesetzt. Zunächst wurde mit Zellen einer Glycerindauerkultur oder Kolonien, die aus einer Transformation hervorgegangen sind, LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker angeimpft. Mit dieser Vorkultur wurde am folgenden Tag die Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ = 0,05-0,1 inokuliert. Die Zellen wurden in 5 l Erlenmeyerkolben (maximal 2 l Zellen pro Kolben) bei 30°C bzw. 37°C unter ständigem Schütteln bei 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3-0,4 herangezogen, und die Temperatur anschließend auf die gewünschte Expressionstemperatur abgesenkt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,6-0,8 durch Zugabe von 0,1-0,5 mM IPTG. Die Dauer und Temperatur der Expression war abhängig von dem zu exprimierenden Protein. Typischerweise wurde 4-6 h bei einer Temperatur von 30°C und 14 h bei einer Temperatur von 20°C exprimiert.

Nach Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 × g für 20 min pelletiert, anschließend mit PBS (*phosphate buffered saline*) (10 mM NaP_i pH 7,2, 130 mM NaCl) gewaschen und erneut bei 5000 × g für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden entweder sofort aufgeschlossen oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.2 Zellaufschluss

Bakterienzellen wurden nach Resuspendieren in Lysispuffer mit Hilfe eines Microfluidizers aufgeschlossen. Dabei wird die Zellsuspension unter Hochdruck (800 bar) zwei- bis dreimal durch eine Kapillare gepresst. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 4°C für 30 min bei 15.000 × g geklärt und die cytosolische Fraktion für die nachfolgende chromatographische Reinigung eingesetzt.

Insektenzellen wurden nach Resuspension in Aufschlusspuffer (100 ml Puffer/5 g Zellen) durch Ultraschallbehandlung unter Verwendung einer 5 mM Mikrospritze aufgeschlossen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte auf Eis, dabei wurden die Zellen maximal 3 mal 15 Pulsen (*Output Control 4, Duty Cycle 90*) ausgesetzt. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde durch Betrachtung der Zellsuspension mit einem Lichtmikroskop überprüft.

3.3.3 Affinitätschromatographie

Nickelaffinitätschromatographie

Die Nickelaffinitätschromatographie wurde zur Reinigung von Proteinen mit einem Hexahistidinaffinitätsanker verwendet. Bei dem eingesetzten Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA)-Säulenmaterial werden Nickel-Ionen derart komplexiert, dass zwei Ligandenbindungsstellen für die Interaktion mit dem Affinitätsanker zur Verfügung stehen. Die cytosolische Proteinfraction wurde mit einer Flussrate von 1,5–3 ml/min auf eine zuvor äquilibrierte NTA-Säule gegeben und solange mit Laufpuffer gewaschen, bis keine Änderung der Absorption zu beobachten war. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial zu verringern, wurde dem Laufpuffer 20 mM Imidazol hinzugefügt. Die Elution des Proteins erfolgte durch Anwendung eines linearen Imidazolgradienten (20 mM-200 bzw. 400 mM Imidazol, 20-30 Säulenvolumina) oder direkt mit dem Elutionspuffer. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die Fraktionen mit dem gewünschten Protein vereint. Das in der Lösung enthaltende Imidazol wurde durch eine Dialyse über Nacht oder durch eine direkt folgende Größenausschlusschromatographie entfernt.

Glutathionaffinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit einem Glutathion-S-Transferaseanker erfolgte mit Säulen, die das GSH 4 *fast flow* Material der Firma GE Healthcare enthielten. Bei diesem Säulenmaterial ist Glutathion durch einen *Linker* kovalent an Sepharose gebunden. Die cytosolische Fraktion wurde mit einer Flussrate von 1,5–3,0 ml/min auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde mit Laufpuffer bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie gewaschen und unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit Hochsalzpuffer (1 M Salzgehalt) entfernt. Die Elution des Proteins geschah durch Laufpuffer mit 10 mM GSH. Nach Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden die gewünschten Fraktionen vereint und der Affinitätsanker über Nacht durch Zugabe von TEV (*Tobacco Etch Virus*) Protease vom Protein entfernt (molares Verhältnis von TEV-Protease zu Protein typischerweise 1:100).

3.3.4 Präparative Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie werden Biomoleküle aufgrund ihres hydrodynamischen Radius getrennt, dabei eluieren große Moleküle früher von der Säule als Kleine. Diese Methode diente der weiteren Reinigung von Proteinen nach der Affinitätschromatographie oder zum Pufferwechsel der Proteine. In Abhängigkeit des Molekulargewichts der Proteine wurden die Superdex 75 16/60 oder die Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) Gelfiltrationssäulen verwendet. Das Volumen der Probe wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit Hilfe von Ultrazentrifugationseinheiten reduziert (0,5–1,5 ml). Die Probe wurde über eine Injektionsschleife auf die Säule geladen, die maximale Flussrate der Läufe betrug 1,5 ml/min. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die gewünschten Proteinfractionen vereint.

3.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Nachweis von Proteinen und zur Bestimmung ihres Reinheitsgrades wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit einem Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem verwendet (Laemmli, 1970). Die relativen Mobilitäten der Proteine verhalten sich hier über einen weiten Bereich linear zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Durch Verwendung eines Molekulargewichtsstandards konnten so die Molekulargewichte der Proteine abgeschätzt werden.

Die Herstellung der Gele sowie die anschließende Elektrophorese wurden mit dem Bio-Rad Mini-Protean III System durchgeführt. Dabei wurden standardmäßig Gele verwendet, die aus einem 15%-18%igen Trenngel bestehen, das mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet wurde. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 2 angegeben. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V oder einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau Färbelösung gefärbt.

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung 15%iger und 18%iger SDS-Gele

	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	0,025 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	157 µl	25 µl
TEMED	5 µl	4,7 µl	1,25 µl
10% (w/v) APS	50 µl	157 µl	12,5 µl

Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS	Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
10x Laufpuffer 250 mM Tris-HCl pH 8,3 2 M Glycin 1% (w/v) SDS	Probenpuffer 62,5 M Tris-HCl pH 6,8 25% (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol
Färbepuffer 5% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Ethanol 0,1% (w/v) Coomassie R250	Entfärbepuffer 5% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Ethanol

3.3.6 Elektrophoretischer Mobilitätsverschiebungstest (EMSA)

Die Methode des elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstests (*electrophoretic mobility shift assay*) beruht auf der unterschiedlichen Mobilität von freier und Protein-gebundener RNA in einer nichtdenaturierenden Gelelektrophorese. Protein-RNA Komplexe weisen eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit als RNA alleine auf und scheinen im Vergleich zu dieser verschoben (*geschifft*) zu sein. Die Methode wird aus diesem Grund auch als Gelverschiebungs- bzw. Gelretardationstest bezeichnet. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe des EMSA die Bindung von Hexim-Proteinen an die 7SK snRNA untersucht werden.

Die 7SK snRNA wurde freundlicherweise von Karin Vogel-Bachmayr generiert, gereinigt und zur Verfügung gestellt. Volle Längen 7SK snRNA (AC: NR_001445) wurde durch *in vitro* Transkription von einer linearisierten DNA-Vorlage unter Verwendung des T7-Promotors und des T7-Polymerase Systems hergestellt. Zwei kürzere RNA-Fragmente, das 66-mer Fragment der 5'-Haarnadelschleife (nt 22-87) und das 39-mer Fragment (nt 9-47) wurden von hochgereinigten, einzelsträngigen, *antisense*-Oligonukleotiden transkribiert (IBA, Göttingen). Die 7SK snRNAs wurden am 5'-Ende durch die Bakteriophage T4-Polynukleotidkinase unter Verwendung von [γ - ^{32}P]-ATP von Sascha Baumann radioaktiv markiert.

EMSAs wurden in einem Volumen von 10 μl mit 2 nM ^{32}P -markierter 7SK snRNA und ansteigenden Konzentrationen von 0,1-8 μM Hexim1 oder Hexim2 oder dem vorgeformten äquimolaren Komplex aus dimeren Hexim und Cyclin T1 von Frau Vogel-Bachmayr durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde den Ansätzen Glycerol (10% (v/v) Endkonzentration) hinzugefügt. Die Proben wurden auf Acrylamid-Gradientengele aufgetragen, die typischerweise aus drei Gradienten mit einer Acrylamidkonzentration zwischen 4% und 10% Acrylamid bestanden. Die Elektrophorese erfolgte auf Eis bei 100 V mit einem Tris/Glycin Laufpuffer. Anschließend wurden die Gele getrocknet und die RNA mit einem *Phosphorimager* (Fla-5000, Fujifilm) nachgewiesen. Die Signale der ungebundenen und gebundenen RNA wurden mit dem AIDA v.3.22 Programm ausgewertet und der Anteil der gebundenen RNA zur Gesamt-RNA gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA) durch Anpassung einer Hill-Funktion an die ermittelten Daten.

10x Bindepuffer
300 mM Tris-HCl pH 7,5
700 mM KCl
0,25% (v/v) IGEPAL
55 mM MgCl₂

10x Gelshiftpuffer
250 mM Tris-HCl pH 8,5
1,92 M Glycin
10 mM EDTA

Tris/Glycin Laufpuffer
25 mM Tris-HCl pH 8,5
192 mM Glycin
1 mM EDTA

3.3.7 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Für die Herstellung der Gele sowie für die nachfolgende Elektrophorese wurde das Mini-Protean-III System der Firma Bio-Rad verwendet. Die Gele setzten sich aus 10% (w/v) Polyacrylamid (19,5 Acrylamid: 1 N,N'-Bisacrylamid) und 7 M Harnstoff in 1 x TBE zusammen. 10 ml dieser Lösung wurden mit 33 µl 10% (w/v) APS und 12 µl TEMED vermischt und in die Gelkammer gegossen. Nach erfolgter Polymerisation erfolgte ein Vorlaufen des Gels für 10 min bei 20 mA in 1 x TBE Laufpuffer. Die in Formamid-Auftragspuffer aufgenommenen Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 2 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20–30 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 2 min in 0,01% (v/v) Ethidiumbromidlösung inkubiert und kurz mit Wasser gespült. Die durch das Ethidiumbromid markierten Nukleinsäuren wurden mit Hilfe von UV-Licht visualisiert.

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

3.3.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) und durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm durchgeführt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode beruht auf der Bindung des Säurefarbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten, wobei die Interaktion mit Arginin bevorzugt ist. Proteinbindung stabilisiert die saure, anionische Form des Farbstoffs und verschiebt das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Bradford-Reagenz von Bio-Rad verwendet. In einem 1 ml Ansatz wurden 1-10 µg Protein in 800 µl Wasser mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Nach 5 min erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Die Konzentration der Probe konnte mit Hilfe einer vorher erstellten Kalibriergerade mit BSA-Protein ermittelt werden.

Proteinbestimmung durch UV-Absorption bei 280 nm

Die Anwesenheit aromatischer Aminosäuren in Proteinen führt zu einer Absorption bei 280 nm. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizientens des Proteins und des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann bei bekannter UV-Absorption die Konzentration der absorbierenden Substanz bestimmt werden. Für die Messung wurde das Spektralphotometer ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) verwendet. Die Berechnung des Extinktionskoeffizientens erfolgte auf Grundlage der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms ProtParam des Internetserver Expasy (<https://us.expasy.org>).

3.3.9 Konzentrierung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Ultrafiltrationseinheiten der Firma Amicon oder bei Volumina größer als 100 ml die Druckluft betriebene Ultrafiltrationseinheit Vivacell250 (Sartorius stedim, Aubagne, Frankreich) eingesetzt. Die verwendete Porengröße der Filtrationseinheiten richtete sich nach dem Molekulargewicht der Proteine. Amicon-Ultrafiltrationseinheiten wurden max. mit $3500 \times g$ zentrifugiert, der Druckluftkonzentrator wurde mit einem Maximaldruck von 4 mbar betrieben.

3.3.10 Reinigung des Positiven Transkriptionelongationsfaktors b (P-TEFb)

Die Insektenzellen wurden zunächst in einem ausreichenden Volumen Lysispuffer resuspendiert und anschließend durch Ultraschallbehandlung auf Eis aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 30 min bei $15.000 \times g$ pelletiert und der Überstand mit einem Fluss von 2 ml/min auf eine mit Laufpuffer äquilibrierte 3 ml NTA-Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde mit Laufpuffer bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie gewaschen (50-80 Säulenvolumen). Die Elution des Proteinkomplexes erfolgte durch Anwendung eines linearen Gradienten von 20-250 mM Imidazol über 30 Säulenvolumina, dabei wurde der Gradient im Falle einer Absorptionserhöhung bei 280 nm angehalten und nach Erreichen der Basislinie weitergeführt. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und P-TEFb enthaltende Fraktionen vereint. Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Proteinlösung mit einem Druckluftkonzentrator bei 4°C auf ca. 1,5-3,0 ml konzentriert und auf eine äquilibrierte Superdex 200 16/60 Säule injiziert. Die Gelfiltration erfolgte bei einer Flussrate von 0,2 ml/min. Im Anschluss wurden die Fraktionen gelelektrophoretisch analysiert. Die Fraktionen, die P-TEFb in ausreichender Reinheit enthielten, wurden vereint und mit Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten konzentriert. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.11 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit 1,5-IAEDANS

Für fluoreszenzbasierte Protein-Interaktionsuntersuchungen (*Stopped Flow*) wurden Proteine an Cysteinen kovalent mit dem Farbstoff 1,5-IAEDANS 5-(((2-Iodoacetyl)-amino)-ethyl)-amino)-naphthalen-1-sulfonsäure modifiziert. Dieser umgebungssensitive Farbstoff besitzt ein Exzitationsmaximum von 336 nm und ein Emissionsmaximum von 490 nm. Die Reaktion des

Farbstoffs 1,5-IAEDANS findet mit freien Thiolgruppen von Proteinen statt, deshalb ist zunächst eine Reduktion dieser Gruppen erforderlich.

Das Protein (100-200 μM in 50 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl) wurde zu diesem Zweck zunächst mit einem zehnfachen molaren Überschuss von TCEP für 30 min auf Eis vermischt. In der anschließenden Markierungsreaktion wurde das reduzierte Protein mit einem zehnfachen molaren Überschuss frisch angesetzter 1,5-IAEDANS Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Hilfe einer PD10 Gelfiltrationssäule entfernt und die Markierung mittels MALDI- oder ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Effizienz der Markierung konnte durch Vergleich der Proteinkonzentration mit der Konzentration der Dansylgruppe bestimmt werden.

3.3.12 GST-pull-down-Experimente

In *GST-pull-down*-Experimenten wird die Bindung zwischen einem an *GSH-beads* immobilisierten GST-Fusionsprotein mit Proteinen aus dem Lösungsüberstand untersucht. Zur Immobilisierung der Proteine wurden diese zunächst als GST-Fusionsproteine bei den für sie optimalen Bedingungen in einem Volumen von 500 ml exprimiert. Die Zellen wurden geerntet, in PBS mit 1 mM PMSF aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0,5% (v/v) Tween20 wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei $10.000 \times g$ für 10 min pelletiert. In denselben Puffer äquilibrierte *GSH-beads* wurden dem Überstand hinzugefügt und die Lösung wurde 2 h bei 4°C auf einem Rollentaumelmischer inkubiert. Anschließend wurden die *beads* durch Zentrifugation (10 min, $2000 \times g$) pelletiert und dreimal mit PBS mit 0,5% (v/v) Tween20 gewaschen. Die so hergestellten *Proteinbeads* wurden bei -80°C gelagert und vor Verwendung gelelektrophoretisch untersucht. Bindungsanalysen wurden in einem Volumen von 200-500 μl in dem jeweiligen Bindungspuffer durchgeführt. Typischerweise wurden 2 μg *GSH-Proteinbeads* und ~ 2 nmol des anderen Proteins eingesetzt. Die Ansätze wurden 2-3 h bei 4°C oder 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die *beads* in der Regel drei Mal mit Puffer gewaschen, in 30 μl SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert

3.3.13 Filterbindungsassay

Zur Untersuchung der Kinaseaktivität von gereinigtem P-TEFb wurde ein radioaktiver Filterbindungsassay angewendet. In dieser Studie wurde ein Ansatz bestehend aus P-TEFb, Substrat, ATP und Spuren von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ auf Phosphozellulosepapier gegeben, das anschließend mit Phosphorsäure gewaschen wurde. Im Gegensatz zu den Nukleotiden binden Proteine unter sauren Bedingungen an das Filterpapier. Durch Messung des inkorporierten radioaktiven Phosphats von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ auf das Proteinsubstrat konnte auf die Aktivität der Kinase zurückgeschlossen werden.

Kinaseansätze wurden in einem Volumen von 35 μl mit 0,1 μM P-TEFb, 100 μM CTD-Substrat, 100 μM ATP und 0,5 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durchgeführt. Nach Zugabe von ATP/ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ wurden die Proben 10 min bei 30°C und schüttelnd bei 300 rpm in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 15 μl eines Ansatzes auf 1 cm^2 Whatman P81 Filterpapier pipettiert, unmittelbar in 0,75% (v/v) Phosphorsäure eingetaucht und 5 min

gewaschen, dabei wurde pro Papierstück mindestens 5 ml Phosphorsäure eingesetzt. Die Filterpapiere wurden zwei weitere Male gewaschen und nach dem letztem Waschschrift in Szintillationsgefäße überführt. Die Radioaktivität der Filterpapiere wurde über einen Zeitraum von einer Minute mit einem Beckmann Coulter Szintillationsgerät unter Verwendung eines „³²P-Programms“ bestimmt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt.

10 × Kinasepuffer
500 mM Hepes pH 7,6
340 mM KCl
70 mM MgCl₂
25 mM DTT
50 mM β-Glycerolphosphat

3.3.14 Analytische Größenausschlusschromatographie

Für die Durchführung der analytischen Größenausschlusschromatographie wurde ein Computer-gesteuertes Waters HPLC-System mit einer Waters 626 Pumpe und einem Waters 2487 Absorptionsdetektor verwendet. Die Proben wurden nach Äquilibration der Säule mit Hilfe eines *Autosamplers* auf die Säule injiziert und mit einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer eluiert. Die Detektion der Proteine bzw. der RNA fand mit dem Zwei-Kanal-Absorptionsdetektor bei den Wellenlängen 280 nm und 220 nm bzw. 254 nm statt. Das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins konnte durch Vergleich des Elutionsprofils des Proteins mit dem Elutionsprofil eines Standards aus globulären Proteinen mit bekannten Molekulargewichten abgeschätzt werden.

Da bei der analytischen Größenausschlusschromatographie nur geringe Protein und RNA-Mengen (~ 0,5-5 nmol) eingesetzt wurden, mussten die gesammelten Fraktionen zunächst konzentriert werden, um die Proteine bzw. RNA mittels Gelelektrophorese visualisieren zu können. Proteine wurden mit Aceton und Nukleinsäuren mit Isopropanol gefällt.

3.3.15 Isopropanolfällung von Nukleinsäuren

Die Isopropanolfällung wurde zur Konzentrierung und anschließenden Analyse von Nukleinsäuren nach analytischen Gelfiltrationsläufen angewendet. Zur Fällung der RNA wurden 200 µl der gesammelten Gelfiltrations-Fraktionen mit 2 µl Glykogen (20 mg/ml) als Trägermaterial (*Carrier*), 20 µl 8 M LiCl₂ und einem Volumenanteil (200 µl) Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei -80°C inkubiert und anschließend 15 min bei 15.000 × g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 15.000 × g) und nach dem Trocknen an der Luft in Formamid-Auftragspuffer aufgenommen.

3.3.16 Acetonfällung von Proteinen

Um geringe Proteinmengen aus größeren Volumina zu isolieren und gelelektrophoretisch untersuchen zu können, wurde eine Acetonfällung durchgeführt. Dabei wurde ein

Volumenanteil Proteinlösung mit vier Volumenanteilen Aceton vermischt, über Nacht bei -20°C inkubiert und das gefällte Protein abzentrifugiert (15 min, $15.000 \times g$). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und nach dem Trocknen in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.3.17 Massenspektrometrie

Zur Massenbestimmung von Proteinen wurde die Matrix-unterstützte Laser-desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) eingesetzt.

MALDI-TOF-MS

Bei dieser Methode wird die Probe mit einer geeigneten Matrix kokristallisiert und anschließend einem kurzen Laserimpuls ausgesetzt, der zum Verdampfen und Ionisation der Matrix und Probe führt. Die entstandenen Ionen werden anschließend im Hochvakuum durch ein elektrisches Feld beschleunigt und ihre Flugzeit (*time of flight*, TOF) für das Durchlaufen einer bestimmten Wegstrecke bestimmt. Aus dieser Zeit kann auf das m/z -Verhältnis der Probe zurückgeschlossen werden. Die Spektrenaufnahme erfolgte mit einem Voyager-DE Pro MALDI Massenspektrometer (Applied Biosystems, Weiterstadt). Zur Probenvorbereitung wurde das Protein mit gleichem Volumen Matrix auf einer MALDI-Platte vermischt und luftgetrocknet. Als Matrix wurde Sinapinische Säure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycimtsäure) in 50% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) verwendet. Die Probe wurde einem Laserimpuls ausgesetzt, wobei die Laserintensität während der Messung zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses manuell geändert wurde. Die Auswahl der verwendeten Methode richtete sich nach dem Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit dem Voyager Software Packet.

ESI-MS

Diese Methode ist im Vergleich zur MALDI-MS sensitiver und weist eine höhere Genauigkeit auf. Der Nachteil ist jedoch die höhere Empfindlichkeit gegenüber der in der Probe vorhandenen Puffer- und Salzionen. Die Proben wurden daher vor Ionisation über eine C_4 -Säule entsalzt. Verwendet wurde ein Agilent 1100 Chromatographiesystem mit einem Finnigan LCQ Advantage MAX Elektrospray-Massenspektrometer sowie VYDAC-Protein- C_4 -Säulen (Grace, Deerfield, IL, USA). Für die Analyse von Peptiden wurde ein HPLC-Gradient angewendet, bei welchem die Probe bei einem Acetonitrilgehalt von 5% (v/v) injiziert wurde. Die Datenauswertung erfolgte mit den Programmen Xcalibur, MagTran sowie BioWorks .

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) oder auch Magnetresonanz stellt neben der Röntgenstrukturanalyse die einzige Methode dar, mit der Strukturen von Molekülen auf atomarem Niveau aufgeklärt werden können. In dieser Arbeit wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt, um strukturelle Informationen über Cyclin T1 Proteinkonstrukte zu

erhalten. Grundlage der NMR-Spektroskopie stellen magnetisch aktive Atomkerne von ^1H , ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P dar. Diese Isotope besitzen einen Kernspin oder Eigendrehimpuls, der einen magnetischen Dipol oder ein magnetisches Moment erzeugt. In der klassischen Betrachtung wird der Spin als Rotation eines Atomkerns um seine Achse beschrieben. Dabei wird die Frequenz der Bewegung, die eine kernspezifische Größe ist, als Larmorfrequenz oder Resonanzfrequenz bezeichnet. Diese Frequenz hängt vom gyromagnetischen Verhältnis γ des Kerns und von der Stärke des äußeren Magnetfeldes ab. Das gyromagnetische Verhältnis γ ist die Proportionalitätskonstante zwischen dem magnetischen Moment und dem Drehimpuls.

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{J} = \gamma \cdot \hbar \cdot \sqrt{I(I+1)}$$

Formel 1: $\vec{\mu}$: Drehmoment, \vec{J} : Drehimpuls, γ : gyromagnetisches Verhältnis, \hbar : Plancksches Wirkungsquantum, I : Quantenzahl des Kernspins

Beim Anlegen eines Magnetfeldes koppelt das magnetische Moment an dieses und richtet sich parallel (energetisch niedrig) oder antiparallel (energetisch hoch) dazu aus. Mit Hilfe von Radiowellenpulsen lassen sich Übergänge zwischen diesen beiden energetischen Zuständen induzieren, deren Relaxation zurück in den Grundzustand anschließend gemessen wird. Die Resonanzfrequenzen sind nicht nur vom Atomkern selbst abhängig, sondern ebenfalls von der chemischen Umgebung in der sich der betreffende Atomkern befindet. So wird die Resonanzfrequenz von der räumlichen Verteilung der Elektronen und der Art der chemischen Bindung in unmittelbarer Nähe des Kerns verändert. Die Verschiebung der Resonanz wird als chemische Verschiebung bezeichnet und relativ zu einer Standardsubstanz (z.B. Tetramethylsilan) in ppm (*parts per million*) angegeben.

Die NMR-Experimente wurden mit ^{15}N -markierten Cyclin T1 Proteinen an einem Varian Inova 600 Spektrometer bei einer Temperatur von 25°C und 15°C durchgeführt. Die Proteine befanden sich in Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,7, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM BME) und wiesen Konzentrationen von 0,5 mM auf.

3.4.2 Expression von uniform ^{15}N -markierten Proteinen

Zur Herstellung ^{15}N -markierter Proteine wurden diese in Minimalmedium exprimiert, das Glucose (10 g/l), $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 g/l) als Isotopenquelle, Spurenelementlösung (10 ml/l) sowie die entsprechenden Antibiotika enthielt. Die Hauptkultur wurde mit Zellen einer Übernachtskultur zu einer $\text{OD}_{600} = 0,1$ inokuliert und zunächst bei 37°C angezogen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer $\text{OD}_{600} = 0,8$ durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Expression fand über Nacht bei einer Temperatur von 30°C statt.

3.4.3 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) ist eine sehr sensitive und schnelle Methode, um die thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen zwei Molekülen zu bestimmen (Wiseman et al., 1989). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die Temperaturen einer Messzelle und einer Referenzzelle durch einen

elektrischen Regelkreis konstant gehalten werden und bei einer in der Messzelle auftretenden Wärmeänderung eine Verringerung oder Erhöhung des Heizstroms nötig ist, um eine sehr kleine Temperaturdifferenz der beiden Zellen konstant zu halten. Die beiden Zellen sind dabei thermisch gegenüber der Außentemperatur isoliert.

In einem ITC-Experiment wird ein in einer Spritze befindlicher Ligand zu einem in der Messzelle vorliegenden Bindungspartner titriert. Aus der Änderung des Heizstroms, der bei einer endothermen oder exothermen Reaktion auftritt, wird die vom Reaktionssystem aufgenommene oder abgegebene Wärmemenge berechnet und diese gegen das molare Verhältnis Ligand (Injektant) / Protein aufgetragen. Aus dem erhaltenen Kurvenverlauf lassen sich die thermodynamischen Parameter der Bindung ΔG , ΔH , ΔS sowie die Stöchiometrie der Interaktion und die Dissoziationskonstante K_d bestimmen.

ITC Experimente wurden mit einem VP-ITC oder einem iTC₂₀₀ (Microcal) durchgeführt. Bei dem VP-ITC beträgt das Volumen der Spritze 250 μl , das der Zelle 1,485 ml. Das Protein aus der Spritze wurde in Injektionsschritten von 8 μl in die Messzelle titriert, der Abstand zwischen zwei Titrationsen betrug 4 min. Das iTC₂₀₀ wurde für Messungen mit dem Heterokomplex P-TEFb eingesetzt. Im Vergleich zum VP-ITC erfordert das iTC₂₀₀ mit einem Spritzenvolumen von 40 μl und einem Zellvolumen von 250 μl bedeutend weniger Arbeitsmaterial. Das Injektionsvolumen betrug 2 μl , zwischen zwei Injektionen wurde ein Zeitintervall von 240 s eingestellt. Die ITC-Messungen wurden bei einer Temperatur von 15° durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proteinlösungen durch Dialyse in denselben Puffer überführt und sorgfältig entgast.

3.4.4 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie (*circular dichroism*, CD) wurde zur Untersuchung des Sekundärstrukturanteils verschiedener Cyclin T1 Proteine eingesetzt. Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte mit einem Jasco J-815 Spektrometer unter Verwendung einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 2 mm. Sämtliche Messungen wurden bei einer Temperatur von 25°C, einem Stickstofffluss von 3 l/min, einer Schrittweite von 1 nm und einer Integrationszeit von 1 s durchgeführt. Die Proteine wurden in 5 mM KP_i Puffer (pH 7,4) verdünnt und bei einer Konzentration von 5 μM gemessen. Mit Hilfe der Formel 2 wurde die erhaltene Elliptizität in die mittlere residuale Elliptizität umgerechnet. Eine Analyse des Sekundärstrukturanteils der Proteine wurde mit dem Programm DICHROWEB (Whitmore and Wallace, 2004) vorgenommen.

$$\theta = \frac{I}{d \cdot c \cdot n}$$

Formel 2: I: Intensität des CD-Signals [mdeg], d: Pfadlänge [mm], c: Proteinkonzentration [M], n: Anzahl der Aminosäuren

3.4.5 Stopped Flow-Messungen

Die Stopped Flow Technik erlaubt die Analyse schneller Reaktionen im Sekunden bis Millisekundenbereich. Diese Methode wurde eingesetzt um die Interaktion von P-TEFb mit dem Inhibitor Hexim zu untersuchen ebenso wie die Wechselwirkung von Tat bzw. Tat-TAR

mit einem vorgeformten Cyclin T1-Hxm1 Komplex. Hexim1 wurde zu diesem Zweck mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1,5-IAEDANS (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) kovalent markiert. Die Messungen wurden an einer SX20 Applied Photophysics *Stopped-Flow* Apparatur bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Dansylgruppe wurde direkt bei 336 nm angeregt und die Fluoreszenz durch einen 420 nm *cut-off*-Filter beobachtet. In der Regel wurden mindestens vier Kurven gemittelt um das Signal-Rausch Verhältnis zu erhöhen. Die verwendeten Proteinkonzentrationen sind im Ergebnissteil angegeben.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Transformation von DH10Bac-Zellen

Zur Transformation wurden ca. 1 ng der pFastBac-Plasmide mit einem Aliquot DH10Bac-Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einem Hitzeschock bei 42°C für 45 min unterzogen, 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 900 µl LB-Medium versetzt. Der Transformationsansatz wurde mindestens 5 Std bei 37°C geschüttelt und anschließend in verschiedenen Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000) auf LB-Differenzierungs-Agar-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37°C wurden weiße Kolonien zur Kontrolle ihres Phänotyps auf Differenzierungsplatten ausgestrichen und am nächsten Tag in 2 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetrazyklin herangezogen und die rekombinante Bacmid-DNA isoliert.

3.5.2 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA

Bacmid-DNA wurde aus 2 ml Kulturen isoliert, die aus Zellen mit einem weißen Phänotyp auf Differenzierungsplatten hervorgegangen waren. Die Zellen wurden 1 min bei 14.000 × g pelletiert und in 300 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v). Nach 5 min wurde 300 µl 3,0 M Kaliumacetat pH 5,5 hinzugefügt und 10 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde für 10 min bei 14.000 × g pelletiert und der Überstand mit 800 µl Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis oder über Nacht bei -20°C wurde 15 min bei 14.000 × g zentrifugiert. Die gefällte Bacmid-DNA wurde einmal mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.5.3 Kultivierung von Sf21 Zellen

Die Kultivierung von Sf21 Zellen erfolgte in TC100 Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum, 1% (v/v) Pluronic-F68 und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung (Komplettmedium). Die Zellen wurden adhärent wachsend in Petrischalen oder als Suspensionskultur in Erlenmeyer- oder Fernbachkolben bei einer Temperatur von 27°C kultiviert. Alle zwei Tage wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml mit frischem Medium verdünnt.

3.5.4 Transfektion von Sf21 Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA

Für die Transfektion wurden 1×10^6 Zellen in einer 6 Lochplatte ausgesät und mindestens für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Pro Transfektionsansatz wurden 6 µl Cellfectin und 5 µl der Bacmid-DNA getrennt mit jeweils 100 µl TC100 verdünnt. Die beiden Lösungen wurden vereint und mit 800 µl TC100 versetzt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde nun langsam auf die ausgesäten Zellen, deren Überstand zuvor entfernt wurde, getropft. Nach einer Inkubationszeit von 5 Std bei 27°C wurde der Transfektionsansatz abgenommen und mit 2 ml Komplettmedium ersetzt. Die Zellen wurden 3 Tage inkubiert, der Viruspartikel enthaltende Überstand (P1) abgenommen, durch Zentrifugation (5 min, 500 × g) geklärt und bei 4°C gelagert.

3.5.5 Virusamplifikation

Für die erste Virusamplifikation wurden 1×10^7 Zellen in einem Volumen von 10 ml in einer Zellkulturschale ausgesät und mit 1 ml des viralen Überstands versetzt. Nach vier Tagen wurde der virale Überstand (P2) abgenommen und wie bereits oben erwähnt geklärt. Im nächsten Amplifikationsschritt wurden 100-200 ml einer Sf21 Kultur mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml mit 1-2 ml des viralen Überstand infiziert und vier Tage inkubiert. Nach Klärung wurde der Virusstock (P3) lichtdicht bei 4°C gelagert.

3.5.6 Proteinexpression in Sf21 Zellen

Die Proteinexpression wurde bei einer Zelldichte von $2-2,5 \times 10^6$ Zellen/ml durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst 10 min bei 2000 × g zentrifugiert und in dem entsprechenden Volumen Komplettmedium aufgenommen. Der virale Überstand (P3) wurde in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:30 hinzugefügt. Nach drei Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 1560 × g) geerntet, mit 1 × PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei -80°C gelagert.

4 Ergebnisse

In der inhibierten Form ist P-TEFb mit den Proteinen Hexim1 oder Hexim2, der kleinen nukleären RNA 7SK und dem Protein Larp7 assoziiert (Kapitel 2.7). Während Hexim1 auf eine bisher ungeklärte Weise die Kinaseaktivität von Cdk9 inhibiert, wird der 7SK RNA eine Komplex-stabilisierende Funktion zugeschrieben (Michels et al., 2003; Yik et al., 2003). Ein Ziel dieser Arbeit war, die Spezifität der beiden Homologen von Hexim bei der Bindung an die 7SK RNA und den Cyclin-Isoformen zu untersuchen. Die hierzu durchgeführten Studien werden im ersten Teil dieses Kapitels dargestellt. Der zweite Teil des Kapitels beschäftigt sich mit der Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 durch Hexim1.

4.1 Die wechselseitige Hexim-Cyclin Interaktion

4.1.1 Identifizierung der Cyclin-bindenden Domäne in Hexim2

Die für die Cyclin-Bindung verantwortliche Domäne (*Cyclin T binding domain*, TBD) in Hexim1 wurde zu Beginn dieser Studie identifiziert und aufgrund ihrer Funktion als TBD bezeichnet (Schulte et al., 2005). Die TBD erstreckt sich von Aminosäure 255 bis 359 des Proteins und enthält ein paralleles, homodimeres, zweigeteiltes *coiled-coil* ($\alpha 2$, $\alpha 3$), dem eine kurze N-terminale Helix ($\alpha 1$) vorausgeht (Dames et al., 2007) (Kapitel 2.7.2). Im Gegensatz zu Hexim1 beschäftigen sich nur wenige Studien mit dem später entdeckten Hexim2 Protein, dessen Gen ebenso wie *hexim1* auf Chromosom 17q21.31 lokalisiert ist. In dieser Arbeit sollte zunächst die Cyclin T-bindende Domäne in Hexim2 identifiziert und charakterisiert werden. Das 286 Aminosäuren lange Hexim2 Protein weist in seinen C-terminalen 120 Aminosäuren über 47% Sequenzidentität zu Hexim1 auf (Abbildung 12). Sekundärstrukturvorhersagen schlagen für diesen Bereich ebenfalls die Ausbildung dreier α -Helices und das Vorliegen einer *coiled-coil* Struktur vor. Dabei erstreckt sich das erste Segment der vorhergesagten *coiled-coil* Region, das aus den Helices ($\alpha 2/\alpha 2'$) besteht, von Aminosäure K210 bis L237, das zweite Segment aus den Helices ($\alpha 3/\alpha 3'$) von V249 bis E276.

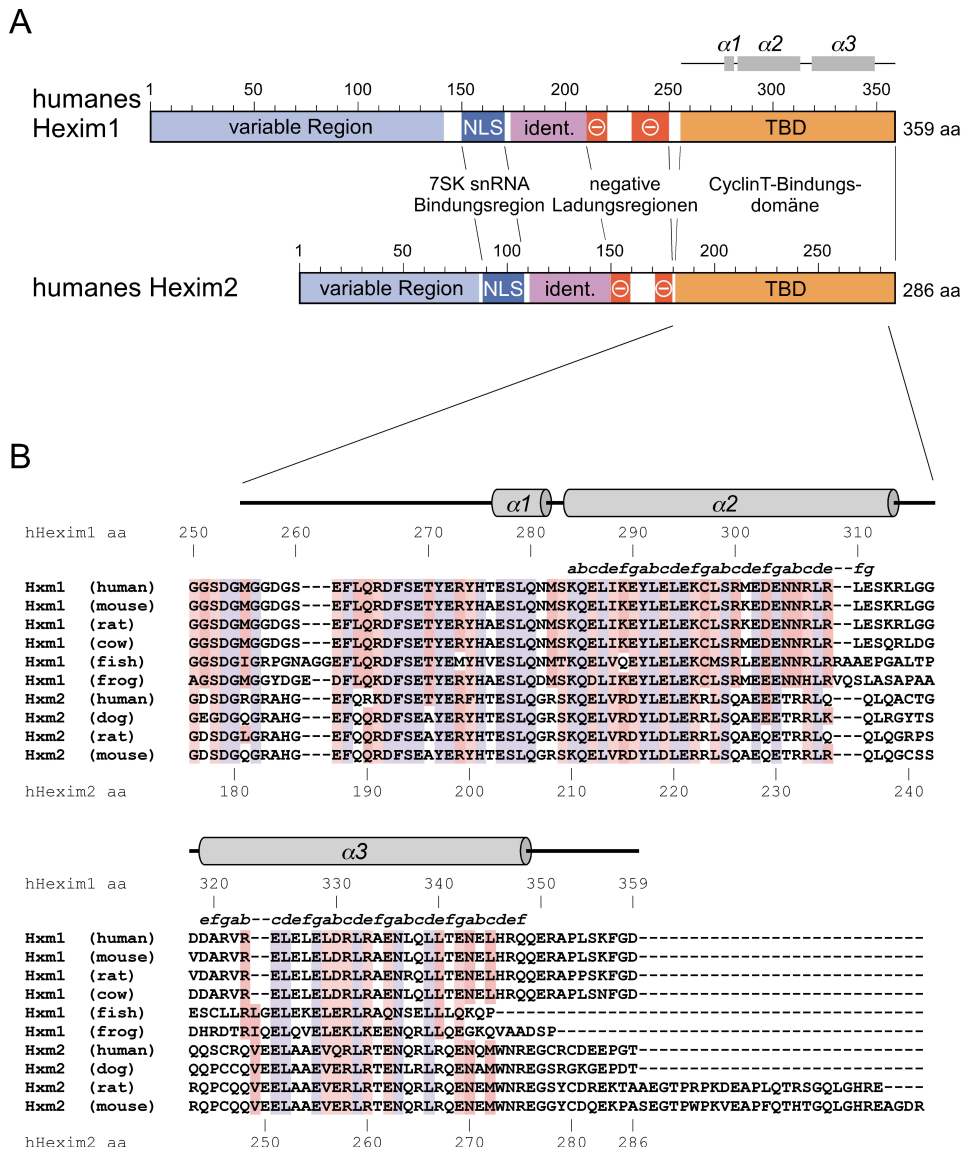


Abbildung 12: Domänenarchitektur von Hexim1 und Hexim2. A: Am N-Terminus der Proteine befindet sich eine variable Region gefolgt von einem nukleären Lokalisationsignal (NLS). Der zentrale Bereich weist eine Region hoher Sequenzidentität zwischen den beiden Homologen auf, C-terminal davon sind zwei negative Ladungsbereiche lokalisiert. Die Cyclin T-Bindungsdomäne (TBD) bildet den C-terminalen Bereich des Proteins. B: Vergleich eukaryotischer Hexim1 und Hexim2-Sequenzen im Bereich der TBD und schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente der humanen TBD. Der Bereich höchster Konservierung zwischen Hexim1 und Hexim2 umfasst Aminosäuren D266 bis L308 (Nummerierung bezogen auf humanes Hexim1). Dieser Bereich schließt eine flexible *Linker*-Region, die kleine Helix α_1 , sowie die erste Helix α_2 des *coiled-coils* ein. Oberhalb des Sequenzvergleichs sind die Positionen *abcdefg* angegeben, die die charakteristischen Wiederholungseinheiten für linksdrehende *coiled-coils* bilden (Dames et al., 2007).

In *coiled-coils* befinden sich die *a*- und *d*-Positionen der Wiederholungseinheit *abcdefg* im Inneren der Struktur und vermitteln dort die Oligomerisierung der Helices. Die Reste dieser Positionen sind typischerweise unpolar. Dagegen sind die Lösungsmittel-exponierten *e*- und *g*-Positionen hauptsächlich von polaren Aminosäuren wie Lysin und Glutaminsäure besetzt. Attraktive ionische Interaktionen zwischen der *g*-Position und der *e*-Position des gegenüberliegenden Stranges (bezeichnet als $i \rightarrow i+5$) stabilisieren das *coiled-coil*, gleiche Ladungen hingegen schwächen es. Für Hexim2 sind die beiden vorgeschlagenen *coiled-coil* Segmente in einem helikalen Rad in Abbildung 13 dargestellt. Im ersten Segment ist eine *a*-Position mit Lysin und die Folgende mit Tyrosin besetzt, was eine Abweichung von der Konsensussequenz darstellt. Dagegen folgen alle *a*- und *d*-Positionen des zweiten

Segments dem Konsensus. Im Falle der *g*-Positionen sind drei der vier Aminosäuren im ersten Segment geladen. Hier verstärkt jedoch nur die Wechselwirkung von R223 und E228 die Bindung der beiden Stränge, die elektrostatische Abstoßung zwischen D216 und E221 wirkt dagegen destabilisierend. Zwischen den Helices ($\alpha 3/\alpha 3'$) kann hingegen die Ausbildung zweier attraktiver ionischer Wechselwirkungen beobachtet werden. Die Sequenzabfolge dieses zweiten Segments folgt dem Konsensus und lässt die Ausbildung eines stabilen *coiled-coils* vermuten.

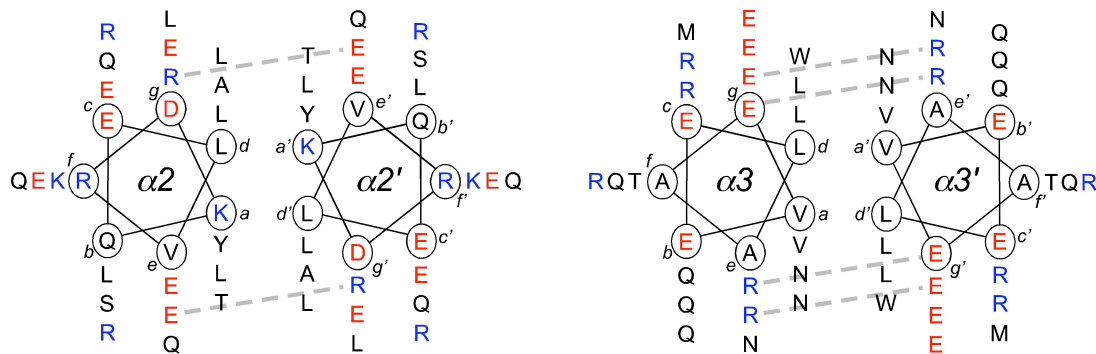


Abbildung 13: Helikales Rad der zwei vorgeschlagenen *coiled-coil* Segmente von Hexim2. Die Positionen *a* bis *g* der Heptad-Wiederholungen sind angegeben. Positiv geladene Aminosäuren werden blau und negative rot hervorgehoben. Ionische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der Position *g* und *e* werden durch gestrichelte Linien verdeutlicht.

Aufgrund der hohen Sequenzidentität im C-terminalen Bereich der beiden Hexim Proteine ist anzunehmen, dass die vorhergesagte *coiled-coil* Struktur auch im Hexim2 Protein die Cyclin T-bindende Domäne darstellt. In den Studien zur Identifizierung der TBD von Hexim1 wurde beobachtet, dass C-terminale Fragmente unterschiedlicher Länge, welche die vollständige *coiled-coil* Region enthielten, unterschiedliche Expressions- und Löslichkeitseigenschaften aufwiesen (Schulte et al., 2005). Für die Identifizierung der entsprechenden Cyclin Bindungsdomäne in Hexim2 wurden deshalb vier verschiedene Konstrukte mit den Grenzen 174-286, 184-286, 192-286 und 207-286 generiert. Die ersten drei Konstrukte umschließen die vorhergesagten Helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), wohingegen das kürzeste Konstrukt erst kurz vor der vorhergesagten parallelen *coiled-coil* Region ($\alpha 2$, $\alpha 3$) beginnt.

4.1.2 Darstellung der Hexim2 Proteinkonstrukte

Die Hexim2 Konstrukte wurden auf Grundlage des Codon-optimierten *hexim2* Gens generiert (Zugangsnummer: AK056946). Dabei wurden elf selten in *E.coli* genutzte AGA- und AGG-Codons gegen häufiger verwendete Codons ersetzt, um eine verbesserte Expression der humanen Proteine in *E.coli* zu erzielen. Ferner wurde eine interne *Nco1* Schnittstelle an Position 483 durch eine stille Mutation entfernt. Die entsprechenden Konstrukte wurden in den prokaryotischen Expressionsvektor pProEx-HTa kloniert, der für einen N-terminalen Hexahistidinanker und einer Erkennungssequenz für die TEV-Protease codiert. So war nach der Expression die Reinigung der Hexim2 Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie möglich.

Alle vier Proteine konnten in löslicher Form exprimiert und gereinigt werden. Die Ausbeuten betragen zwischen 7-11 mg/l Bakterienkultur, dabei wies das Konstrukt Hexim2 207-286 die höchste, und Hexim2 184-286 die niedrigste Ausbeute auf.

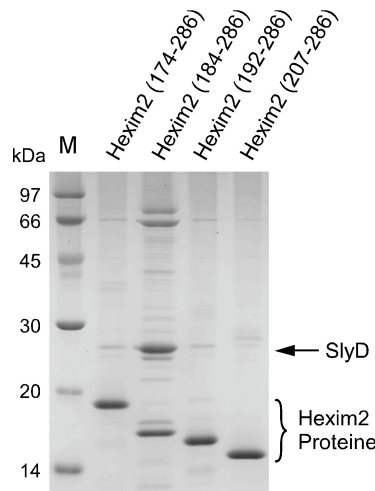


Abbildung 14: Darstellung der Reinheit der Hexim2 Proteine nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Ca. 3 µg der Proteine wurden auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Färbung visualisiert. Alle Proteine wiesen eine Verunreinigung bei ca. 26 kDa auf, die als das Protein SlyD aus *E.coli* identifiziert werden konnte. Hexim2 184-286 wies zudem Verunreinigungen bei 66 kDa auf, diese Banden stellen möglicherweise Chaperone dar.

Die obige Abbildung zeigt die Reinheit der noch den Hexahistidinanker enthaltenden Proteine nach dem ersten chromatographischen Reinigungsschritt. Bei allen Proteinen wurde eine Verunreinigung bei 26 kDa beobachtet, die für Hexim2 184-286 am stärksten war. Durch sogenanntes *Peptide-Mass-Fingerprinting* konnte dieses Protein als FKBP-ähnliche Peptidyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase SlyD aus *E.coli* (PPLase, Zugangsnummer P30856) identifiziert werden. SlyD, welches ein Molekulargewicht von 20,85 kDa aufweist, ist als Metall-bindendes Protein bekannt und als häufig vorkommende Verunreinigung bei der Metall-Chelat-Chromatographie beschrieben worden (Bolanos-Garcia and Davies, 2006; Graslund et al., 2008). Um den Reinheitsgrad der Hexim2 Proteine zu erhöhen, wurde im Anschluss an die Ni-NTA-Affinitätschromatographie eine präparative Gelfiltration durchgeführt. So konnte SlyD bei den Hexim Proteinen weitgehend abgetrennt werden.

4.1.3 Darstellung weiterer Proteine für die Interaktionsanalysen

Für die folgenden Bindungsanalysen wurden des Weiteren Hexim1 fl (fl: *full length*, volle Länge), sowie die Cyclin-Boxen von Cyclin T1 und Cyclin T2 gereinigt. Alle Proteine wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert. Nach einem ersten chromatographischen Reinigungsschritt mit einer GSH-Säule wurde der GST-Anker mittels Verdau mit der TEV-Protease entfernt und durch präparative Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Superdex 75 16/60 Säule in Kombination mit einer GSH-Säule entfernt. Die Ausbeute für Hexim1 fl lag bei 0,5 mg/l, für die Cyclin-Boxen bei 5 mg/l Expressionskultur. Der Reinheitsgrad der Proteine wurde mittels SDS-Gelelektrophorese abgeschätzt und betrug über 90%. Die Molekulargewichte der gereinigten Proteine wurden mittels MALDI-MS oder LC-ESI-MS überprüft (siehe Anhang).

4.1.4 Interaktion der C-terminalen Hexim2 Proteine und Cyclin T1

Die Analyse der direkten Bindung zwischen den Hexim2 Proteinen und den Cyclin-Boxen von Cyclin T1 erfolgte zunächst mit Hilfe eines *GST-pull-down*-Experiments. Dieses Experiment wurde von Friederike Vollmuth in ihrer Diplomarbeit durchgeführt. GST-Cyclin T1 1-281 wurde an GSH-*beads* immobilisiert und anschließend die Bindung der gereinigten Hexim2 Proteine an das Cyclin T beobachtet. Als Positivkontrolle diente die TBD von Hexim1, als Negativkontrolle wurde freies GST eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die drei längsten Hexim2 Konstrukte an Cyclin T1 binden, wobei für Hexim2 192-286 nur eine schwache Bande beobachtet wurde (Abbildung 15, Spuren 4, 7 und 10). Im Gegensatz dazu wurde Hexim2 207-286, dem die N-terminale α 1-Helix fehlt, von GST-Cyclin T1 nicht aus der Lösung präzipitiert (Spuren 12 und 13). SlyD, das in stöchiometrischen Mengen zu Hexim2 184-286 vorlag, zeigte ebenfalls keine Bindung an GST-Cyclin T1. Sowohl die vorausgehende Helix α 1 als auch die *coiled-coil* Region scheinen somit für die Bindung an Cyclin T1 verantwortlich zu sein.

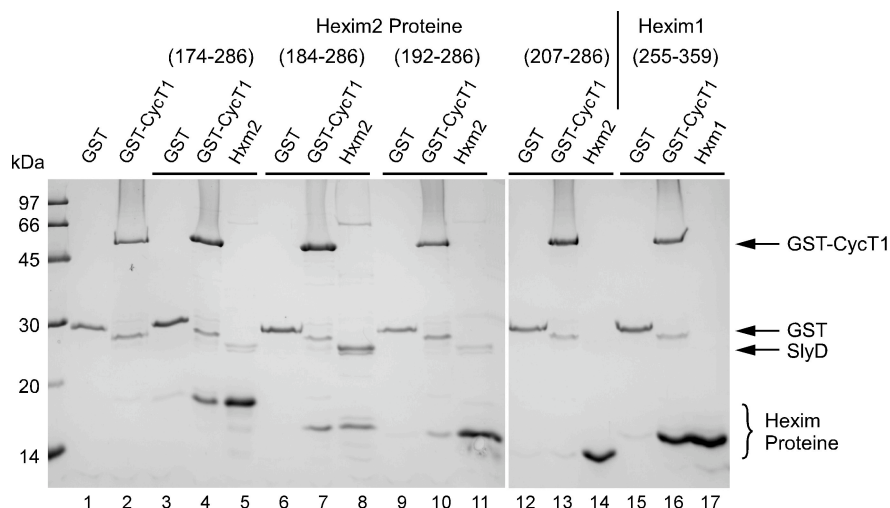


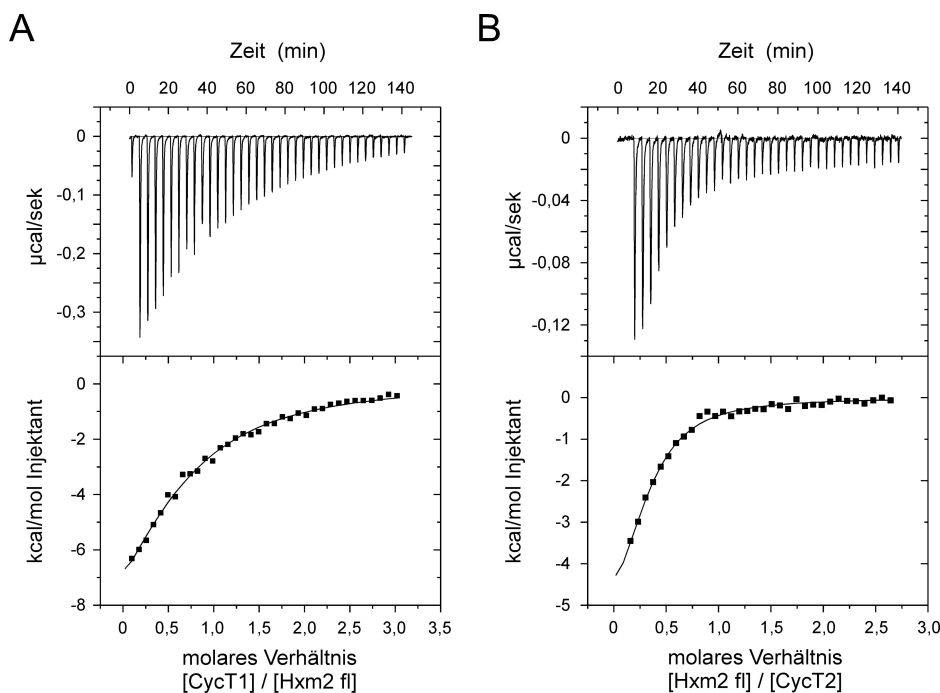
Abbildung 15: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des *pull-down*-Experiments mit GST-Cyclin T1 1-281 und den unterschiedlichen C-terminalen Hexim2 Proteinen. Die Bindungsanalysen wurden in 50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol durchgeführt.

4.1.5 Bindungsspezifität zwischen Hexim1 und Hexim2 zu Cyclin T1/T2

Die Bindung zwischen Hexim2 174-286 und Cyclin T1 wurden durch isotherme Titrationskalorimetrie weiter untersucht. Um zu ermitteln, ob neben der C-terminalen Domäne weitere Bereiche von Hexim2 an der Cyclin-Bindung beteiligt sind, wurde diese Messung ebenfalls mit Hexim2 fl durchgeführt. Durch Messung der wechselseitigen Interaktionen zwischen Hexim1/2 und Cyclin T1/T2 sollten ferner Hinweise auf eine mögliche Spezifität der Hexim-Cyclin Komplexbildung erhalten werden. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Friederike Vollmuth durchgeführt.

Alle ITC-Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 15°C. Im Falle der Messung von Cyclin T1 mit His-Hexim2 174-286 bzw. Hexim2 fl befanden sich die Hexim-Proteine in der Messzelle, die Konzentration betrug 12 μ M für das verkürzte Hexim2 und 21 μ M für Hexim2 fl. Cyclin T1 in der Injektionsspritze hatte jeweils eine mehr als zehnfach höhere

Konzentration und wurde in Injektionsschritten von 8 μl zu den Hexim Proteinen titriert. Die thermodynamischen Parameter der durchgeführten ITC-Messungen sind in der in Abbildung 16 enthaltenden Tabelle zusammengefasst. Exemplarisch wird die Messung zwischen Cyclin T1 und Hexim2 fl im Teil A der Abbildung dargestellt. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass Hexim2 174-286 mit einer Dissoziationskonstante von 10,3 μM eine ähnliche Bindungsaffinität zu Cyclin T1 aufweist wie Hexim2 fl zu Cyclin T1 (Dissoziationskonstante von 10,9 μM). Dies weist darauf hin, dass alle für die Cyclin-Bindung relevanten Interaktionen über den C-terminalen Bereich des Proteins vermittelt werden. Ähnliches wurde ebenfalls bei Untersuchungen zur Hexim1-TBD Bindung an Cyclin T1 beobachtet. Hier wurden Dissoziationskonstanten von 2,3 μM für Hexim1 fl und 4,7 μM für die Hexim1-TBD an Cyclin T1 beobachtet (Dissertation von André Schönichen). In zwei weiteren ITC-Messungen wurden die Interaktionen von Hexim1 fl und Hexim2 fl mit Cyclin T2 untersucht. Letztere Messung ist in Teil B der Abbildung dargestellt. Diesmal wurden die Hexim-Proteine schrittweise zu einer in der Messzelle befindlichen 15 μM Cyclin-Lösung titriert. Beide Reaktionsverläufe zeigten einen exothermen Kurvenverlauf. Die ermittelten Dissoziationskonstanten betragen 6,4 μM für Hexim1 fl und 2,5 μM für Hexim2 fl.



Titrationsschema	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	K_d (μM)	molares Verhältnis n
Hexim1 fl zu Cyclin T1	-7,4	-13,1	-5,6	2,3	0,6
Cyclin T1 zu Hexim2 fl	-6,6	-14,4	-7,8	10,3	0,6
Cyclin T1 zu Hexim2-TBD	-6,6	-31,5	-25,0	10,9	0,5
Hexim1 fl zu Cyclin T2	-6,9	-12,5	-5,6	6,4	0,7
Hexim2 fl zu Cyclin T2	-7,4	-6,7	0,7	2,5	0,3

Abbildung 16: ITC-Messungen der Interaktionen zwischen Hexim1/2 und Cyclin T1/T2 sowie Bindungsaffinitäten dieser Interaktionen. A: ITC-Messung zwischen Cyclin T1 und Hexim2 fl. B: ITC-Messung zwischen Hexim2 fl und Cyclin T2. Dargestellt sind jeweils der Verlauf der Heizleistung sowie die Auftragung der Wärmetönung jeder Injektion gegen das molare Verhältnis von Ligand/Bindungspartner in der Zelle. Alle ITC-Messungen wurden bei 15°C (278 K) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Origin7.0.

Interessanterweise wurden somit die höchsten Affinitäten für die Hexim1-Cyclin T1 Interaktion sowie die Hexim2-Cyclin T2 Bindung bestimmt. Die jeweilige Messung von Hexim1 mit Cyclin T2 bzw. Hexim2 und Cyclin T1 zeigten eine bis zu vierfache Abnahme der Affinitäten. Durch Kontrollexperimente, in denen jeweils das in der Injektionsspritze befindliche Protein in Puffer titriert wurde, konnten Verdünnungseffekte für die beobachtete Wärmetönung ausgeschlossen werden. Für alle Interaktionen wurde ein Stöchiometriefaktor n von 0,5 bestimmt, unabhängig davon, ob sich die Hexim Proteine in der Spritze oder Messzelle befand. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass beide Hexim-Homologe als Dimer ein monomeres Cyclin T1 binden.

4.1.6 Molekulare Dispersion des Hexim2-Cyclin T1 Komplexes

Zur weiteren Charakterisierung der Hexim2-TBD und der Komplexbildung mit Cyclin T1 wurde analytische Größenausschlusschromatographie angewendet. Hierbei wurden äquimolare Mengen von Hexim2 174-286 und Cyclin T1 1-281 auf eine BioSep SEC-S4000 Säule aufgetragen. Die Molekulargewichte der Proteine wurden durch Vergleich mit den Elutionszeiten eines Molekulargewichtsstandards abgeschätzt. Cyclin T1 eluierte bei 10,1 ml entsprechend seines Molekulargewichts von 35 kDa. Dagegen eluierte Hexim2 bereits bei 9,8 ml, was für ein globuläres Protein einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa entsprechen würde. Das TBD-Dimer weist jedoch ein Molekulargewicht von 26 kDa auf. Ein ähnliches Elutionsverhalten wurde schon zuvor für die Hexim1-TBD beobachtet und ist auf die elliptische Form der *coiled-coil* Struktur des Proteins zurückzuführen (Dames et al., 2007; Schulte et al., 2005). Eine solche Struktur bedingt einen größeren hydrodynamischen Radius im Vergleich zu einem globulären Protein gleichen Molekulargewichts und damit ein früheres Elutionsvolumen. Die Cyclin T1-Hexim2 Probe eluierte bei einem früheren Elutionsvolumen von 9,4 ml als Hexim2 alleine. Dies deutet auf eine Komplexbildung der beiden Proteine hin und kann auf die Vergrößerung der Ausmaße des geformten Proteinkomplexes zurückgeführt werden.

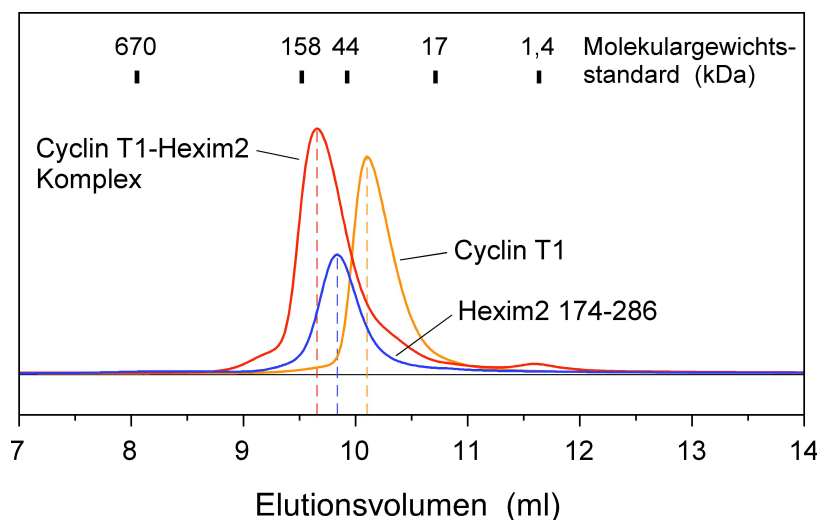


Abbildung 17: Analytische Größenausschlusschromatographie von Hexim2 174-286 (blau), Cyclin T1 1-281 (orange) und dem entsprechenden Hexim-Cyclin (rot) Komplex, der durch Inkubation von 30 nmol Hexim mit 5 nmol Cyclin T1 gebildet wurde. Es wurde ein Puffer mit 50 mM Hepes pH 7,2, 50 mM NaCl und 1 mM TCEP verwendet.

4.1.7 Bindung von Hexim1/2 an den nukleären Importfaktor Importin α

Sowohl Hexim1 als auch Hexim2 weisen einen zentralen Bereich positiver Ladung auf, der im Falle von Hexim1 die Aminosäuren 150 bis 165 und für Hexim2 die Aminosäuren 88 bis 103 umfasst. Für Hexim1 wurde gezeigt, dass diese Region nicht nur für die Interaktion mit der 7SK snRNA, sondern ebenfalls für die nukleäre Lokalisation des Proteins essentiell ist (Barboric et al., 2005). Auf Basis der Sequenzabfolge des basischen Bereichs wird die Existenz sogenannter nukleärer Importsignale (*nuclear localisation signal*, NLS) vorgeschlagen. Kernimportsignale sind Sequenzmotive, die entweder aus einem drei bis fünf Aminosäuren langem *Cluster* basischer Reste bestehen (*monopartite NLS*) oder aus einem kleineren Lysin/Argin-*Cluster*, das 10-12 Aminosäuren von einem dem *monopartite* ähnlichen *Cluster* getrennt liegt (Cook et al., 2007). Letztere NLS werden auch als zweigeteilte NLS (*bipartite NLS*) bezeichnet. Die Konsensussequenzen für die genannten Lokalisationssignale lauten KKxK bzw. KR_{x10-12}KRxK. In Abbildung 18 sind die vorgeschlagenen nukleären Lokalisationssignale für Hexim1 und Hexim2 dargestellt. Hexim1 enthält ein zusätzliches Motiv positiver Ladungen von Position 175 bis 177, das zu der Bildung eines zweigeteilten NLS beitragen könnte (Barboric et al., 2005).

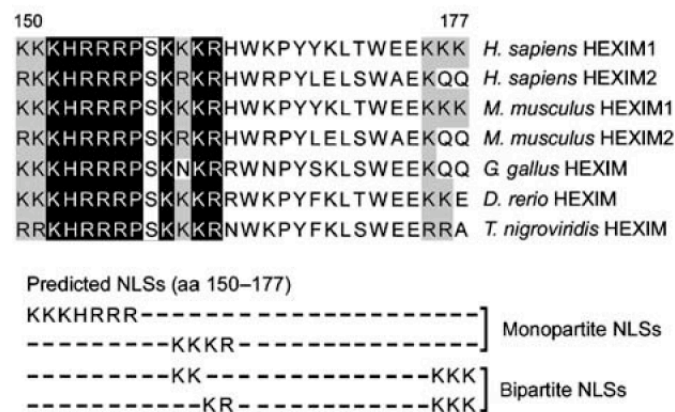
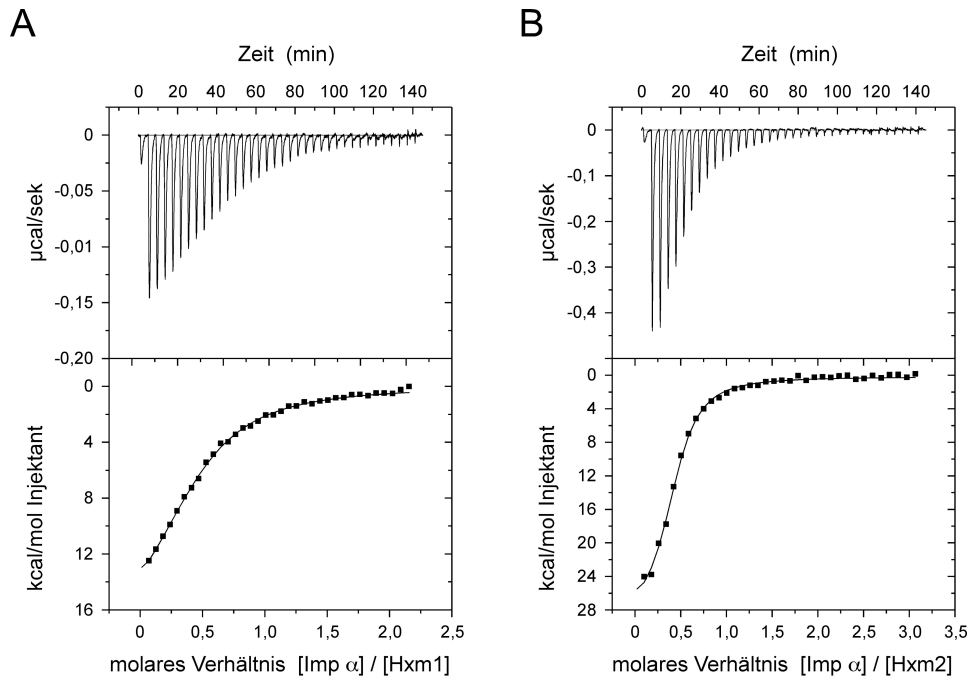


Abbildung 18: Vergleich der basischen Regionen von humanen Hexim1 und Hexim2 und vorhergesagte *mono-* und *bipartite* NLS von Hexim1. Die Abbildung ist entnommen aus: Barboric et al., 2005.

NLS enthaltende Proteine werden in einem Importkomplex bestehend aus Importin α und Importin β durch die Kernpore in den Zellkern befördert. Die Interaktion mit dem NLS findet dabei spezifisch über die Armadillo-Wiederholungen von Importin α statt (Cook et al., 2007; Stewart, 2007). Im Zellkern führt die Bindung von RanGTP an Importin β zu einer Dissoziation des Importkomplexes und zu einer Freilassung des Kargos. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von Hexim1/2 mit Importin α mittels isothermer Titrationskalorimetrie und GST-*pull-down*-Experimenten untersucht. Dabei sollte ferner analysiert werden, ob sowohl Importin α als auch Cyclin T1 gleichzeitig an Hexim1/2 binden können und so Hexim1 als Carrier der nukleären Lokalisation von Cyclin T dienen könnte, das kein kanonisches NLS aufweist. Für die Bindungsstudien wurde ein Fragment von Importin α verwendet, das nur die Armadillo-Wiederholungen nicht aber die auto-inhibitorische N-terminale Importin β Bindedomäne enthält. Zudem wurde der C-Terminus der letzten Armadillo-Wiederholung (Wiederholung 10), welche nicht an der Bindung des NLS beteiligt ist, deletiert. Das resultierende Protein Importin α 72-499 konnte löslich in *E. coli*

exprimiert und durch Anwendung chromatographischer Reinigungsmethoden in ausreichender Konzentration (10 mg/ml) und Reinheit erhalten werden (Abbildung 20). Für die ITC Messungen wurde Hexim1 fl bzw. Hexim2 fl in einer Konzentration von ungefähr 10 μM in der Messzelle vorgelegt und mit sukzessiven Titrationschritten einer zehnfach bis fünfzehnfach höher konzentrierten Importin α Lösung gesättigt.



Titrationsschema	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	K_d (μM)	molares Verhältnis n
Importin α zu Hexim1	-7,5	-18,9	-11,4	2,0	0,5
Importin α zu Hexim2	-8,3	-29,1	-20,7	0,5	0,4

Abbildung 19: ITC-Messungen und thermodynamische Parameter der Interaktionen von Importin α mit Hexim1 fl und Hexim2 fl. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 288 K durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt die ITC-Messungen der beiden Hexim-Homologe mit Importin α . Sowohl für Hexim1 als auch für Hexim2 liegen die Affinitäten zu Importin α im niedrigen mikromolaren Bereich, was für eine mittelstarke Bindung charakteristisch ist. Für Hexim2 wurde sogar eine geringfügig höhere Affinität bestimmt. Somit scheint eine Beteiligung des zweiten positiven Ladungsclusters in Hexim1 an der Bindung von Importin α unwahrscheinlich.

In einem GST-pull-down-Experiment wurde des Weiteren untersucht, ob die Bindung von Importin α an Hexim1 die Interaktion von Hexim1 und Cyclin T1 bzw. T2 beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde GST-Hexim1 fl an GSH-Beads immobilisiert und mit einem Überschuss Cyclin T1, Cyclin T2 und Importin α inkubiert. Nach Waschschrinen zur Abtrennung nichtgebundener Proteine wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

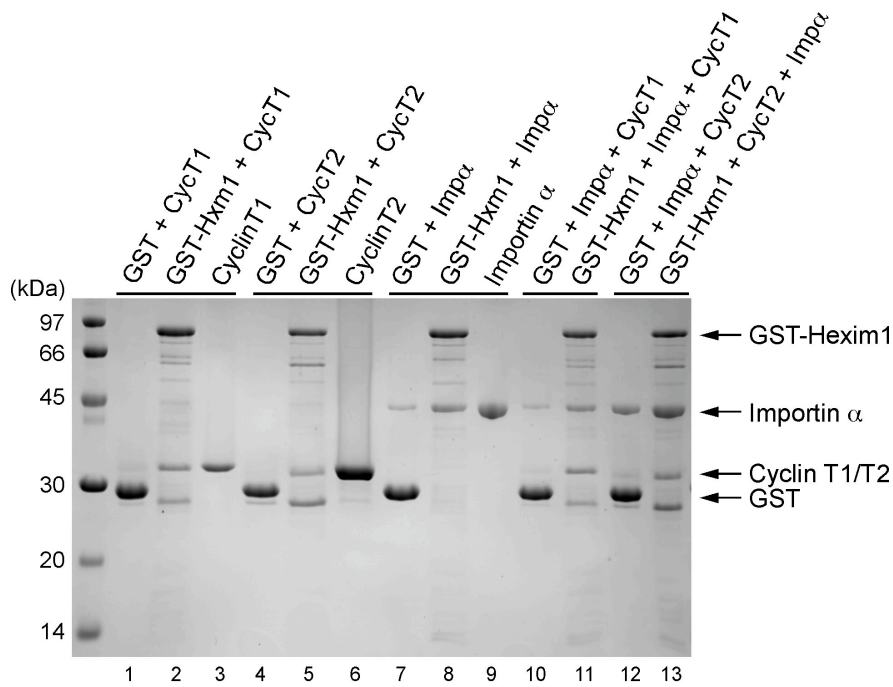


Abbildung 20: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des GST-*pull-down*-Experiments zur Analyse der Bindung von Cyclin T1/T2 und Importin α und einer möglichen Komplexbildung.

Wie schon in den ITC-Messungen gezeigt, konnte auch hier die Bindung der einzelnen Proteine an Hexim1 fl beobachtet werden (Abbildung 20, Spuren 2, 5, 8). Bei Anwesenheit aller Proteine (GST-Hexim1, Cyclin T1/T2 und Importin α) waren die Intensitäten von Cyclin T1/T2 und Importin α genauso stark, wie zuvor bei den Einzelinkubationen beobachtet (Spuren 11, 13). Dies deutet auf das Vorliegen eines trimeren Komplexes hin, dessen Existenz konnte jedoch mit diesem Experiment nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Ein *pull-down*-Experiment, bei dem sich der GST-Anker an Importin α oder Cyclin T befindet, wäre für eine solche Analyse zweckmäßiger. Die weitere Untersuchung eines trimeren Komplexes mittels analytischer Größenausschlusschromatographie war nicht möglich, da das Hexim1 fl Protein im Ausschlussvolumen eluierte (Daten nicht gezeigt).

4.2 Die Interaktion von Hexim mit der 7SK RNA

4.2.1 Bindung von Hexim1-Cyclin T1 an die 7SK RNA

Hexim1 bindet die 7SK RNA über sein KHRR-Motiv, das im basischen Bereich des Proteins lokalisiert ist. Welche Elemente der 7SK RNA jedoch für die Bindung von Hexim1 essentiell sind, ist nicht geklärt. Während in einer Studie gezeigt wurde, dass eine 66-mer Haarnadelschleife (nt 22-87) am 5'-Ende der RNA für die Bindung von 7SK RNA an Hexim1 verantwortlich ist (Egloff et al., 2006), wurde in einer anderen Studie eine Haarnadelschleife aus den Nukleotiden 10-48 als minimale Hexim1 bindende Region *in vitro* identifiziert (Li et al., 2007). Zu Beginn dieser Arbeit wurden unter Verwendung des Programms Mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>) zunächst Faltungsvorhersagen für die 7SK RNA (Zugangsnummer: NR_001445.1) durchgeführt (Zuker, 2003). Basierend auf diesen Analysen bildet die 7SK RNA vier Haarnadelschleifen aus, die zweite Schleife ausgehend vom 5'-Ende ist dabei in zwei kleinere Haarnadelstrukturen verzweigt (Abbildung 21 A). In der vorhergesagten energetisch günstigsten Struktur stimmt die erste Schleifenstruktur mit der von Egloff *et al.* vorhergesagten Hexim-bindenden 7SK 66-mer Haarnadelschleife überein, die in Abbildung 21 A in rot markiert ist. Der Bereich der 39-mer RNA ist in der Abbildung in blau hervorgehoben.

Hier sollten die Affinitäten der beiden in der Literatur vorgeschlagenen RNA-Fragmente an den Hexim-Cyclin T Komplex verglichen werden. Diese Fragmente sowie die Vollängen 7SK RNA wurden von Frau Karin Vogel-Bachmayr durch *in vitro* Transkription hergestellt und gereinigt. Alle drei RNAs erwiesen sich als ausreichend stabil und wurden von Sascha Baumann unter Verwendung der T4-Polynukleotidkinase und [γ - 32 P]-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert. Mit diesen RNAs und Hexim1 fl sowie einem vorgeformten Hexim1-Cyclin T1 Komplex wurden Gelverschiebungsanalysen (EMSA) durchgeführt. Die RNA-Konstrukte wurden hierbei in Konzentrationen von 1-2 nM eingesetzt und mit ansteigenden Proteinkonzentrationen inkubiert. Ungebundene und Protein-gebundene RNA wurde durch native Acrylamid-Gelelektrophorese mit Gradientengelen getrennt, über Autoradiographie visualisiert und mit Hilfe des Programms AIDA quantifiziert. Der Bindungsgrad der RNA, d.h. der Anteil Protein-gebundener RNA zur Gesamt-RNA wurde bestimmt und gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Als ein Maß für die ungefähre Dissoziationskonstante des Protein-RNA-Wechselwirkung wurde die Proteinkonzentration bestimmt, bei der die Hälfte der RNA in den Protein-RNA Komplex überführt wurde (3.3.6). Die EMSA-Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt und einzeln quantifiziert. In der folgenden Abbildung sind die drei in dieser Arbeit verwendeten RNA-Konstrukte, sowie exemplarisch drei mit diesen RNAs durchgeführte EMSAs und die Auswertung dieser dargestellt.

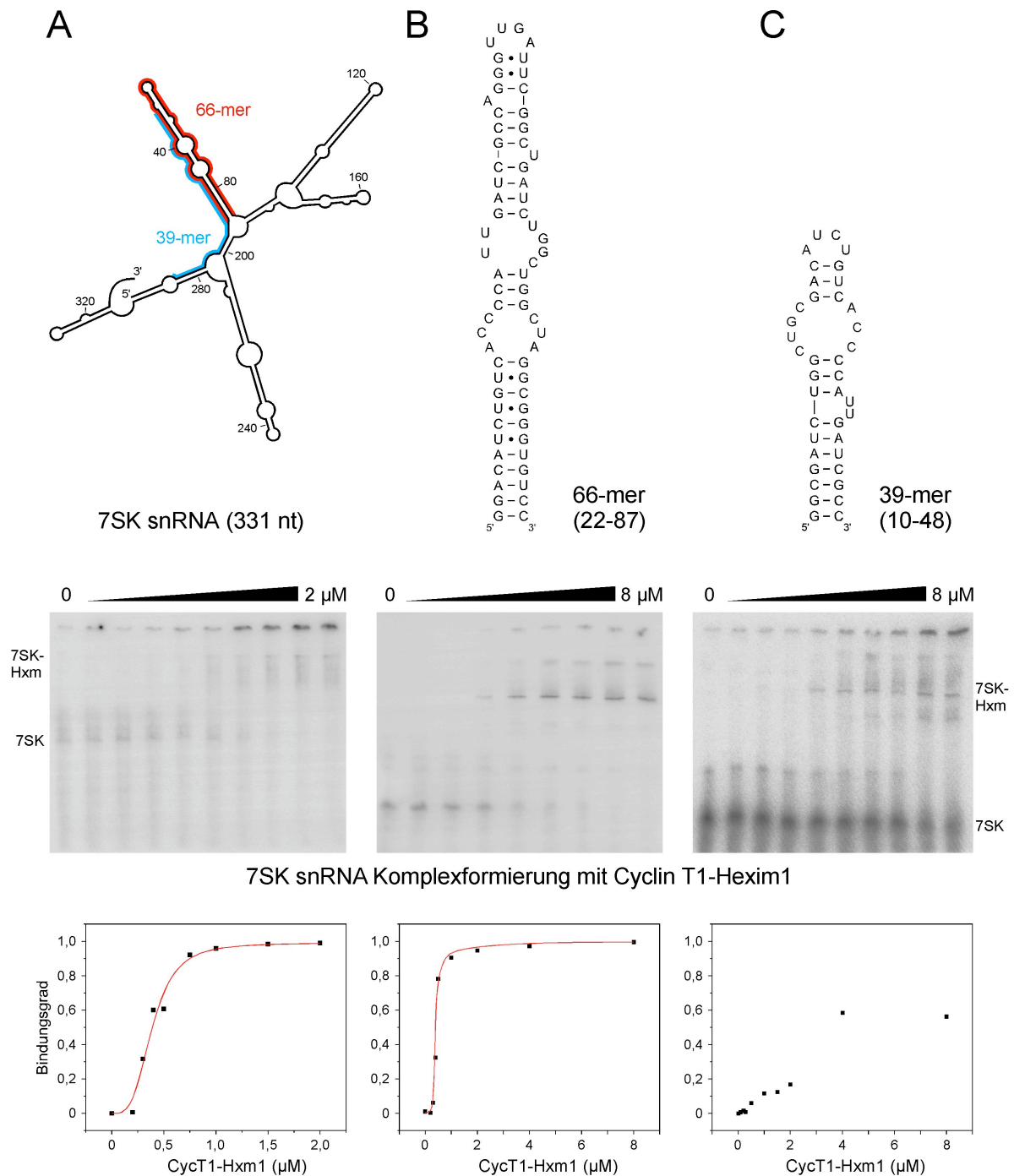


Abbildung 21: Bindungsanalysen des Cyclin T1-Hexim1-Komplexes und der 7SK RNA sowie zweier verkürzter Fragmente der 7SK RNA. Oben: Darstellung der nach Mfold vorhergesagten 7SK RNA Sekundärstrukturen. Mitte: EMSAs der 7SK RNAs mit dem Cyclin T1-Hexim1-Komplex. Unten: Auswertung der gezeigten EMSAs.

Für die Vollängen 7SK RNA wurde das Gleichgewicht von gebundener zu ungebundener RNA bei einer Hexim1-Cyclin T1 Komplexkonzentration von $0,32 \pm 0,06 \mu\text{M}$ erreicht. Der entsprechende Wert für das 66-mer RNA Fragment unterscheidet sich mit $0,41 \pm 0,05 \mu\text{M}$ kaum von dem für Vollängen 7SK RNA erhaltenen Ergebnis und deutet darauf hin, dass dieses RNA-Konstrukt für die Bindung an Hexim1-Cyclin T1 ausreichend ist. Im Gegensatz hierzu konnte die 39-mer RNA (10-48) selbst bei Proteinkonzentrationen von $8 \mu\text{M}$ nicht vollständig in den Protein-RNA Komplex verschoben werden, eine Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde daher nicht vorgenommen. Die Auswertung der EMSAs und

somit die Ermittlung von Dissoziationskonstanten wurde durch die Tatsache erschwert, dass die verwendeten Hexim Proteine unspezifisch RNA und DNA aus *E.coli* gebunden hatten. Diese RNA konnte trotz Anwendung unterschiedlicher Reinigungsstrategien, wie z.B. Proteinreinigung unter Hochsalzbedingungen, nur unzulänglich abgetrennt werden. Eine Behandlung des Hexim1 Proteins mit RNase resultierte in einen Abbau der 7SK RNA bei den Experimenten, da die RNase nur unvollständig abgetrennt bzw. inaktiviert werden konnte. Unklar ist, ob die mit Fremd-RNA beladenen Moleküle im gleichem Maße zur Bindung von 7SK befähigt sind, wie nicht beladenes Hexim1. Zudem ist es möglich, dass bei höheren Proteinkonzentrationen das basische Motiv von Hexim1 mit der 7SK RNA auch außerhalb des physiologischen RNA-Bindungsmotivs interagiert und so mehr als ein Hexim-Molekül mit der RNA assoziiert ist. In der Tat wird vor allem für die Vollängen 7SK RNA beobachtet, dass bei hohen Proteinkonzentrationen der Komplex nicht mehr in das Gel einläuft. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte dienen die ermittelten Affinitäten lediglich einer vergleichenden Analyse.

4.2.2 Bindung der Hexim-Homologe an die 5'-Schleife der 7SK RNA

In einer weiteren Serie von Gelverschiebungsanalysen wurden die Affinitäten für Vollängen Hexim1 und Hexim2 an die 7SK RNA (22-87) untersucht. Zusätzlich wurde ein N-terminal deletiertes Hexim1 110-359 mit in die Analysen einbezogen, da dieses Hinweise auf die Existenz einer möglichen selbstinhibierenden Region in Hexim1 liefern sollte. Es wurde vorgeschlagen, dass die dem RNA-Bindungsmotiv und NLS vorausgehenden N-terminalen Reste von Hexim1 dieses Segment verdecken und als selbstinhibitorische Region wirken könnten (Li et al., 2005; Michels et al., 2004). Da sich dieser N-terminale Bereich für die beiden Hexim-Homologe sowohl in der Länge als auch Sequenz stark unterscheidet, wurde angenommen, dass Hexim2 eine solche selbstinhibitorische Region möglicherweise nicht besitzt. Drei exemplarische EMSA-Analysen mit diesen Proteinen sowie deren Auswertung sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

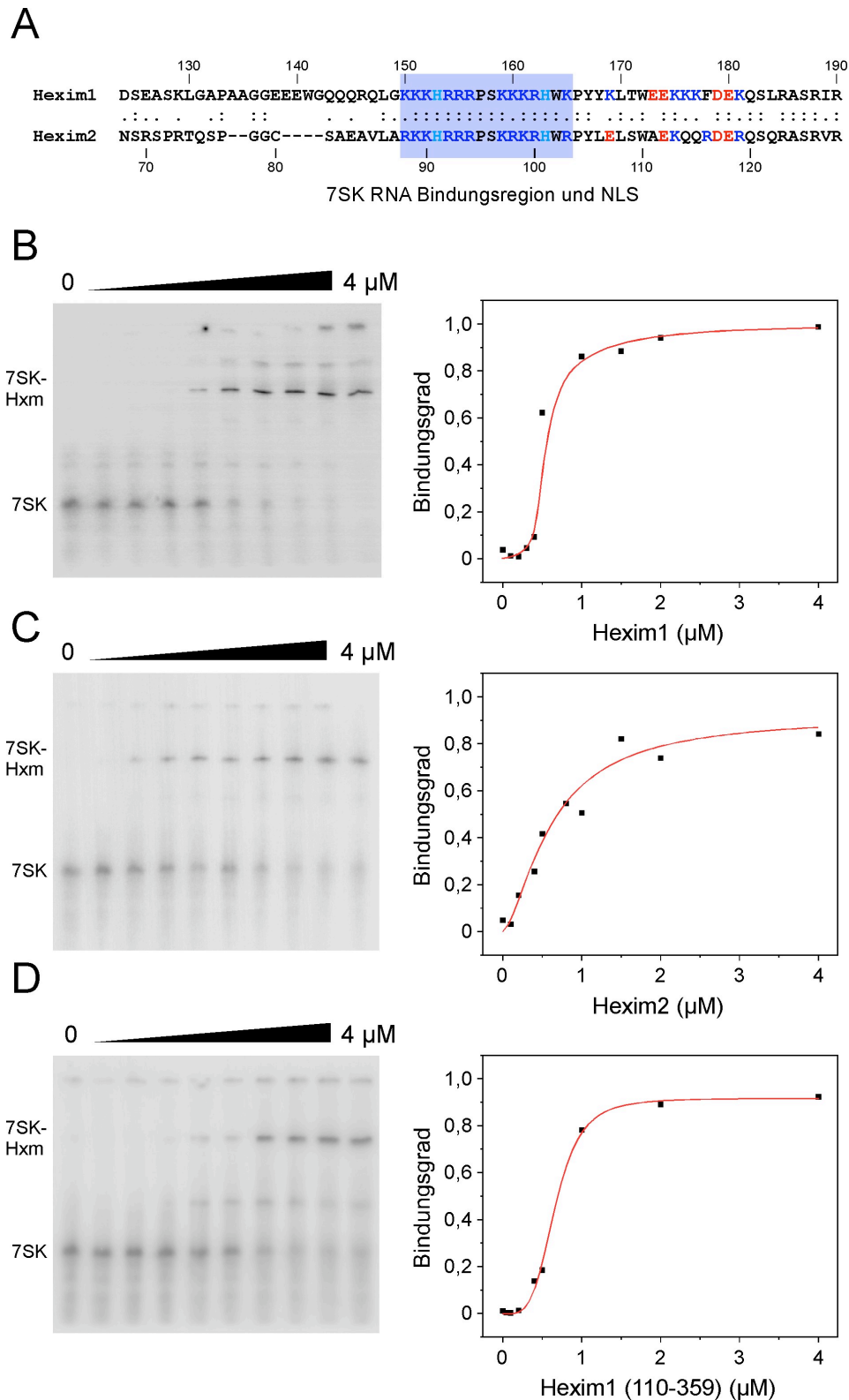


Abbildung 22: Analyse der Hexim1 und Hexim2 Bindung an die 5'-Haarnadelschleife der 7SK RNA. Sequenzalignment der zentralen basischen Region von Hexim1 und Hexim2. Das für die nukleäre Lokalisation und RNA-Bindung notwendige Lysin- und Arginin-reiche Motiv ist in blau hinterlegt. Positiv geladene Aminosäuren sind zusätzlich in dunkelblau, negativ geladene Aminosäuren C-terminal von diesem Motiv in rot hervorgehoben. B-D. Bindungsanalysen für Hexim1 fl, Hexim2 fl und dem N-terminal verkürzten Hexim1 110-359.

Die Durchführung und Auswertung der EMSAs erfolgte wie bereits beschrieben. Für Hexim1 fl wurde die halbmaximale Verschiebung der RNA in den RNA-Protein Komplex bei

einer Proteinkonzentration von $0,46 \pm 0,02 \mu\text{M}$ erreicht. Ein ähnlicher Wert wurde mit $0,52 \pm 0,10 \mu\text{M}$ für Hexim2 fl erhalten. Der entsprechende Wert für das N-terminal deletierte Protein beträgt $0,58 \pm 0,09 \mu\text{M}$. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Hexim1 und Hexim2 das 66-mer RNA-Konstrukt gleichermaßen affin binden und dass die N-terminale Region in Hexim1 die Bindung der Proteine an die RNA nicht negativ beeinflusst. Darüber hinaus wurden ähnliche Affinitäten für Hexim1 und für Hexim1 im Komplex mit Cyclin T1 an die RNA ermittelt. Cyclin T1 scheint somit die Bindung von Hexim an die 66-mer RNA nicht zu beeinflussen. Zu berücksichtigen ist jedoch auch hier, dass das Bindungsverhalten der Hexim1 und Hexim2 Proteine an die RNA durch ein unterschiedliches Ausmaß an Verunreinigung mit Fremd-RNA verschieden beeinflusst worden sein könnte.

Es wurden ebenfalls Kontrollexperimente mit einem 58 nt langen Fragment der *E. coli* 23S rRNA sowie den Hexim fl Proteinen und dem N-terminal verkürzten Hexim1 durchgeführt. Diese RNA wurde von Sascha Baumann zur Verfügung gestellt. In den EMSA-Analysen war keine Bindung der Hexim Proteine an die RNA zu beobachten. Ein geringer Anteil der RNA präzipitierte jedoch in der Tasche des Gels. Ferner wurde ein EMSA-Experiment mit der 66-mer 7SK RNA und der Hexim1-TBD durchgeführt. Auch hier konnte keine Bande, die einem RNA-Protein Komplex zuzuordnen ist, beobachtet werden. Die in dieser Arbeit untersuchte Interaktion der Hexim Proteine mit der 7SK RNA ist somit sequenzspezifisch.

4.2.3 Charakterisierung der Hexim1-7SK RNA Komplexbildung

Die in den EMSAs beobachtete Komplexbildung zwischen der 66-mer Haarnadelschleife der 7SK RNA und Hexim1 110-359 wurde anschließend mittels analytischer Größenausschlusschromatographie charakterisiert. Vor Verwendung der RNA wurde diese durch Erhitzen auf 80°C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur renaturiert. Hierdurch konnten nach der Reinigung der RNA vorhandene Aggregate aufgelöst werden, wie in der folgenden Abbildung dargestellt ist.

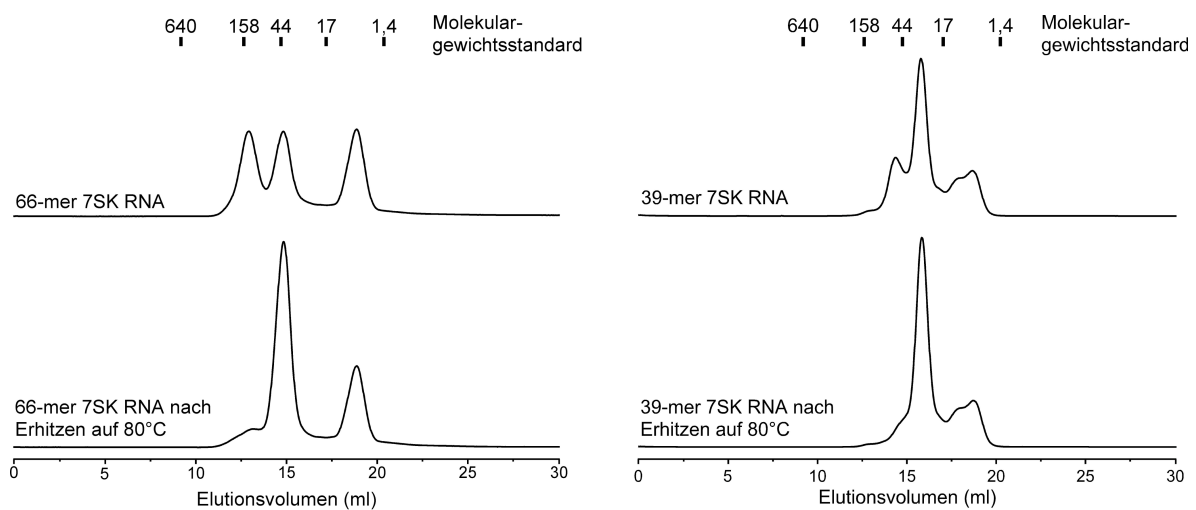


Abbildung 23: Analytische Gelfiltration der 66-mer und der 39-mer 7SK RNA-Konstrukte. Verwendet wurde eine analytische Superdex 200 10/300 Säule. Oben: RNA nach Gelextraktionsreinigung. Unten: Renaturierte RNA-Konstrukte.

Deutlich ist anhand der Elutionsprofile zu erkennen, dass die RNA nach dem Erhitzen als homogene Spezies vorliegt. Der bei einem Elutionsvolumen von ca. 18 ml auftretende *Peak* ist auf einzelne Nukleotide zurückzuführen.

Um die Interaktion zwischen Hexim1 und 7SK RNA zu charakterisieren, wurde das Säuleneluat der Größenausschlusschromatographie von 5,5 ml – 20,5 ml in 500 µl Fraktionen gesammelt und der Gehalt an 7SK RNA und Hexim1 in diesen Fraktionen untersucht. Da die Komplexbildung nur im analytischen Maßstab durchgeführt wurde und die Protein- sowie RNA-Mengen der Fraktionen für eine direkte Gelanalyse zu gering war, wurde zunächst eine Fällung der RNA und des Proteins durchgeführt (Kapitel 3.3.15, 3.3.16). Die Fällungsprodukte wurden in dem entsprechenden Auftragspuffer aufgenommen und anschließend mit Ethidiumbromid- gefärbten Harnstoffgelen bzw. Coomassie-gefärbten SDS-Gelen nachgewiesen (Abbildung 24 B-D). Das Chromatogramm, das nach Auftragen von 1 nmol RNA auf die mit 50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM β-Mercaptoethanol equilibrierte Säule erhalten wurde, zeigt einen Peak mit einem Maximum bei einem Elutionsvolumen von 15 ml. Entsprechend wurde die RNA im Harnstoffgel nur in den Fraktionen 19-22 nachgewiesen. Die dabei beobachtete schwächere, tieferlaufende Bande ist wahrscheinlich auf ein Abbaufragment der RNA zurückzuführen. Das Chromatogramm von Hexim1 hingegen weist einen Elutionspeak bei 7,8 ml mit einem starken *Tailing* zu späteren Elutionsvolumina auf. Das frühe Elutionsverhalten steht in Einklang mit der Existenz der länglichen *coiled-coil* Struktur am C-Terminus des Proteins. Das Elutionsprofil, das nach Inkubation von Hexim1 und 7SK RNA beobachtet wurde, weist weiterhin einen großen Hexim-*Peak* bei 7,8 ml auf, dazu einen zu früheren Elutionszeiten verschobenen 7SK RNA-*Peak* bei 14 ml sowie einen neu entstandenen *Peak* bei 11,5 ml. Dieser neue *Peak* (Fraktionen 12,13) entspricht einem Molekulargewicht von ca. 210 kDa und konnte durch Gelelektrophorese als Komplex zwischen Hexim1 und der 7SK RNA identifiziert werden (Abbildung 24 D).

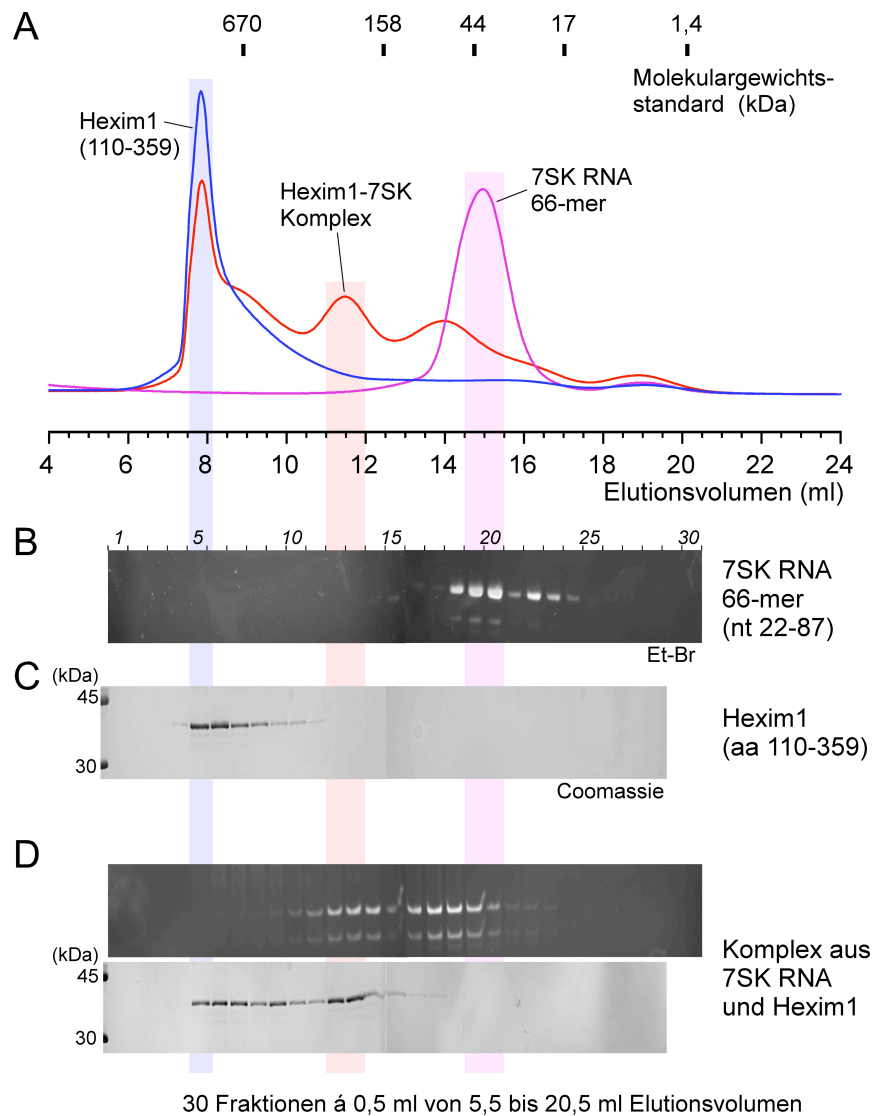


Abbildung 24: Komplexbildung von Hexim1 110-359 und 7SK RNA (22-87). A: Größenausschlusschromatographie von Hexim1, 7SK RNA und des Hexim1-7SK RNA Komplexes unter Verwendung einer analytischen Superdex 200 10/30 Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte für Proteine bei 280 nm und für RNA bei 260 nm. Der Durchfluss wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und durch SDS- und Harnstoffgelelektrophorese analysiert. B: Harnstoffgel des 7SK RNA-Eluats. Es kann ebenfalls eine schwächere Ethidiumbromid-gefärbte Bande beobachtet werden, die wahrscheinlich ein Abbaufragment der RNA darstellt. C: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des Hexim1 Eluats. D: Harnstoffgel und SDS-Gel der Elution des 7SK-Hexim1 Komplexes.

Mit Hilfe dieser Methode war es somit möglich, einen spezifischen Hexim1-7SK RNA Komplex zu formieren und zu isolieren.

4.2.4 Darstellung von RNA freiem Hexim1 und Interaktion mit der 7SK RNA

Zum Ende dieser Arbeit gelang es durch die Verwendung von Benzonase-Endonuklease Hexim1 fl Protein zu erhalten, das weitestgehend frei von kontaminierender RNA war. Benzonase ist eine promiskuitiv agierende Endonuklease, die jegliche Form von RNA und DNA zu Oligonukleotiden von 2-3 Basen Länge abbaut. Das Enzym wurde nach Herstellerangaben eingesetzt und der Proteinlösung nach der ersten Affinitätssäule hinzugefügt. Eine Trennung der Benzonase von Hexim1 konnte durch Ionenaustauschchromatographie erfolgen, da Hexim1 mit einem pI von 4,8 bei pH 8 an das Säulenmaterial

eines Anionenaustauschers bindet, Benzonase hingegen nicht. In Abbildung 25 A und B sind die Reinheit sowie eine analytische Größenausschlusschromatographie von Hexim1 fl dargestellt. Im Gegensatz zu vorherigen Experimenten eluierte das Hexim1-Dimer mit einem Molekulargewicht von 84 kDa nun nicht mehr im Ausschlussvolumen sondern als Protein mit einem Molekulargewicht über 200 kDa. Das Elutionsdiagramm weist neben dem Hexim-*Peak* ferner einen *Peak* bei einem Elutionsvolumen von 19 min auf. Dieser *Peak* könnte auf einzelne Nukleotiden zurückzuführen sein, die nach der Endonukleaseverdau an dem Protein gebunden blieben. Dieses würde in Einklang mit dem erhaltenen $OD_{260/280}$ Verhältnis von 0,9 für Hexim1 stehen, das auf eine geringe Kontamination von Nucleinsäuren hinweist. Mit diesem Protein und der 7SK RNA (22-87) wurde anschließend ein EMSA durchgeführt, der in Teil C der Abbildung dargestellt ist.

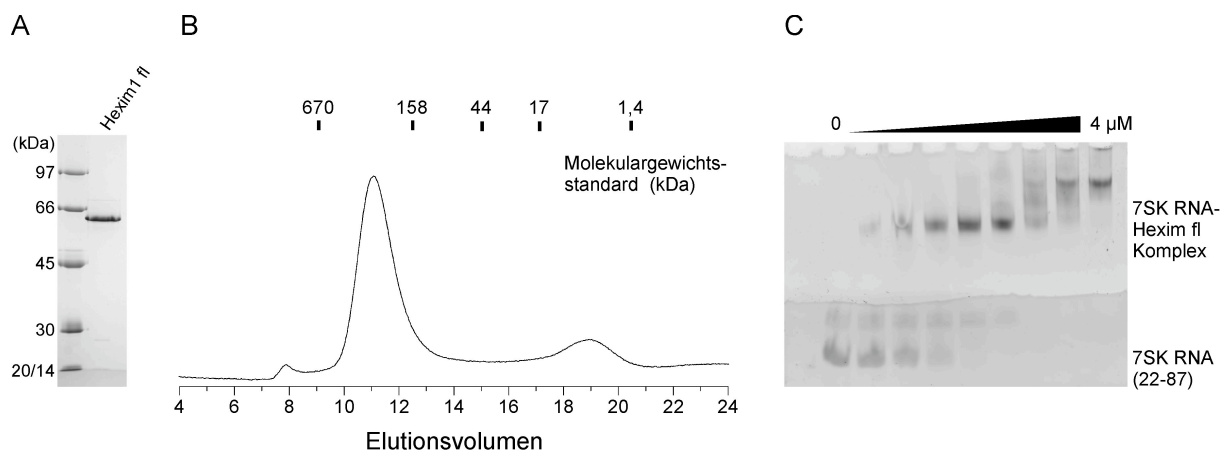


Abbildung 25: A: SDS-PAGE des Benzonase-behandelten Hexim1 fl Proteins. B: Analytische Größenausschlusschromatographie von Hexim1 fl unter Verwendung einer Superdex 200 10/30 Säule. Die Säule wurde vor dem Auftragen mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP equilibriert und das Molekulargewicht des Proteins durch Verwendung eines Molekulargewichtsstandards abgeschätzt. C: EMSA mit der 7SK RNA (22-87) und dem Hexim1 fl Protein. Die RNA wurde nach Ethidiumbromidfärbung mit UV-Licht visualisiert.

Deutlich ist zu erkennen, dass bei ansteigender Hexim-Konzentration zunächst ein RNA-Protein Komplex entsteht, der bei höheren Protein-Konzentrationen vollständig in einen zweiten Komplex geringerer Mobilität übergeht. Erstmals konnte somit ein echter *Supershift* der RNA beobachtet werden. Es befindet sich keine RNA in den Taschen des Gels, wie es zuvor in den radioaktiv durchgeführten EMSAs der Fall war. Die Hexim1-Konzentration, bei der 50% der RNA in den Hexim-7SK RNA Komplex übergegangen ist, beträgt nach Abschätzung anhand des Gels zwischen 0,5 und 1 μM , der zweite Übergang erfolgte bei etwa 3 μM Hexim1 fl.

4.3 Untersuchung der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1

Die Untersuchung des inhibitorischen Einflusses von Hexim1 auf die Kinaseaktivität von P-TEFb erforderte zunächst die Expression und Reinigung des aktiven P-TEFb Komplexes. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, besteht P-TEFb aus der Kinase Cdk9 und einer regulatorischen Cyclin-Untereinheit (T1, T2 oder K). In dieser Arbeit wurde der Heterokomplex aus Cdk9 und Cyclin T1 generiert, welcher in HeLa Zellen über 80% des zellulären P-TEFb formt. Dabei wurde jedoch nicht mit Vollängen Cyclin T1, sondern nur mit den Cyclin-Boxen gearbeitet, die für die Formierung eines aktiven P-TEFb Komplexes ausreichend sind.

4.3.1 Darstellung des positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P-TEFb)

Expression von P-TEFb in *E.coli*

Zunächst wurde versucht, P-TEFb durch Coexpression von Cdk9 und Cyclin T1 aus *E.coli* zu gewinnen. Da die Aktivität von Cdk9 eine Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife der Kinase erfordert, diese posttranslationale Modifikation in prokaryotischen Expressionssystemen wie *E.coli* jedoch nicht gewährleistet ist, sollte die negative Ladung der Phosphogruppe durch Mutation von Thr186 in Glutamat oder Aspartat nachgeahmt werden. Für die Expression wurde Cdk9 als GST-Fusionsprotein in pGEX-4T1 TEV (amp) bzw. pGEX-2T TEV (amp) und Cyclin T1 in pET28a (kan) in BL21(DE3) Zellen cotransformiert. Die anschließende Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über den GST-Anker von Cdk9. Sowohl für das wt-Protein als auch für die Mutanten konnte eine Expression des Komplexes beobachtet werden, jedoch wies dieser Komplex keine äquimolare Stöchiometrie auf (Abbildung 26). Die Anwesenheit von Cdk9 wurde durch *Peptide-Mass-Fingerprinting* bestätigt. Ein Konzentrieren der erhaltenen Proteinlösung nach Abschneiden des GST-Ankers von Cdk9 führte jedoch unmittelbar zur Präzipitation beider Proteine. Daher wurden verschiedene Cdk9 und Cyclin T1 Konstrukte mit unterschiedlichen N- und C-terminalen Grenzen generiert sowie Änderungen der Expressionsbedingungen (Temperatur, Zeit, IPTG-Konzentration) vorgenommen. Dies hatte jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des Proteins.

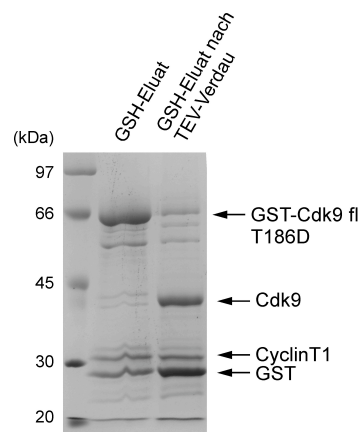


Abbildung 26: SDS-Gel von Cdk9 fl T186D und Cyclin T1 1-272. Links: Probe vor TEV-Verdau. Rechts: Probe nach TEV-Verdau über Nacht bei 4°C.

Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass ein rekombinant hergestelltes P-TEFb Substrat von diesem aus *E.coli* hergestelltem P-TEFb Komplex nicht phosphoryliert wurde (Daten nicht gezeigt).

Expression von P-TEFb in Baculovirus-infizierten Insektenzellen

Da P-TEFb nicht stabil aus *E.coli* isoliert werden konnte, wurde Cdk9 mit Hilfe des eukaryotischen Baculovirus-Expressionssystems gewonnen. Dieses Expressionssystem erlaubt posttranslationale Modifikationen von Proteinen, wie z.B. Phosphorylierungen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: Zum einen wurde die Kinase in Insektenzellen (*Sf21* Zellen) exprimiert und der P-TEFb Komplex durch Zugabe von rekombinant in *E.coli* hergestelltem Cyclin T1 zu Beginn der Reinigung formiert. Ferner erfolgte eine Coexpression von Cdk9 und Cyclin T1 in *Sf21* Zellen.

Für den ersten Ansatz wurde das Cdk9-Gen in voller Länge in den Vektor pFastBacHTb kloniert. Der im Vektor codierte N-terminale His-Tag ermöglichte dabei die Reinigung des Proteins mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die Rekonstitution des P-TEFb Komplexes erfolgte durch Zugabe von reinem Cyclin T1 1-272 zu resuspendierten *Sf21* Zellen. Abbildung 27 zeigt exemplarisch die durch Anwendung eines linearen Imidazolgradienten eluierten Fraktionen der Ni-NTA Affinitätschromatographie, die den ersten Reinigungsschritt darstellte.

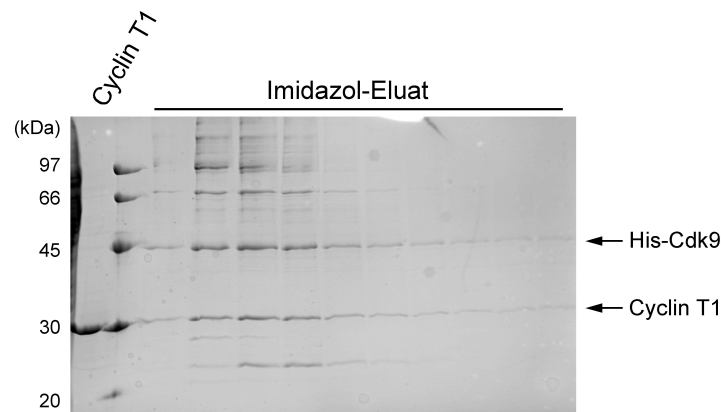


Abbildung 27: SDS-PAGE der Reinigung von P-TEFb. Dargestellt sind die mit einem Imidazolgradienten eluierten Fraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Das rekombinant aus *E.coli* isolierte Cyclin T1 Protein ist in der linken Spalte dargestellt.

Zur Erhöhung des Reinheitsgrads wurden die P-TEFb enthaltenden Fraktionen einer präparativen Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 16/60) unterzogen. P-TEFb konnte durch diesen Reinigungsschritt von den in der Probe enthaltenen Verunreinigungen erfolgreich getrennt werden (Abbildung 28 A). Im SDS-Gel waren zwei den Molekulargewichten von Vollängen His-Cdk9 und Cyclin T1 1-272 entsprechende Banden mit gleicher Intensität sichtbar, was auf eine äquimolare Stöchiometrie der beiden Proteine schließen lässt. Eine sehr schwache unterhalb von His-Cdk9 laufende Bande könnte Cdk9 ohne His-Tag zugeordnet werden. Der Komplex konnte bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml konzentriert werden, was einer molaren Konzentration von 11,6 μM entspricht. Die Ausbeuten waren mit durchschnittlich 0,5 mg P-TEFb/l Baculovirus-Expressionskultur jedoch gering. Durch LC-ESI-MS wurde das Molekulargewicht von Cdk9 zu 42985 Da bestimmt.

Dieser Wert unterscheidet sich um genau 80 Da von dem berechneten Molekulargewicht (42905,6 Da) und deutet auf eine vollständige Mono-Phosphorylierung des Proteins hin. Der Cdk9-Cyclin T1 Komplex eluierte als homogener Peak von einer analytischen Gelfiltrations-säule.

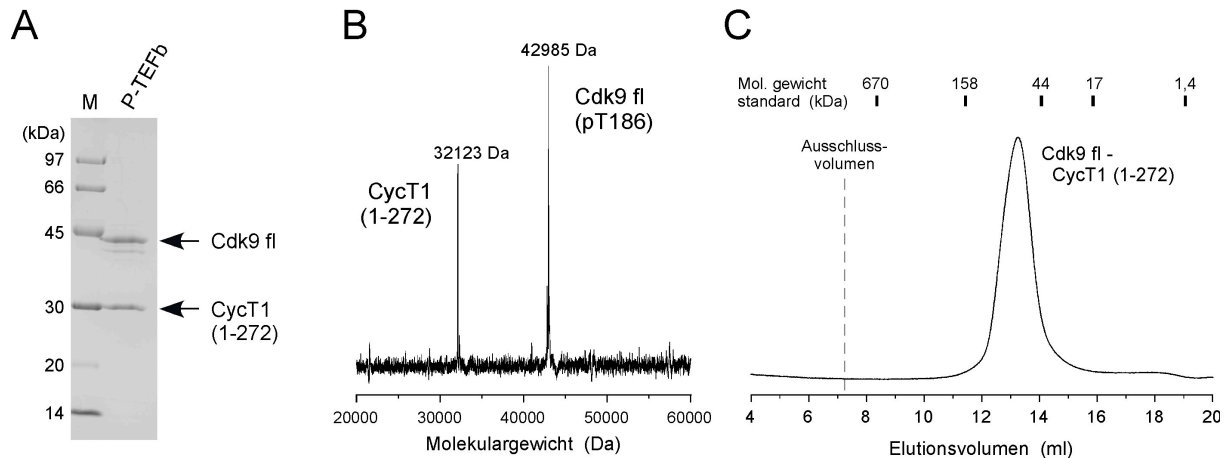


Abbildung 28: Reinheit, Molekulargewicht und Homogenität des dargestellten P-TEFb Komplexes. A: Das SDS Gel zeigt die hohe Reinheit der Probe und das Vorliegen eines stöchiometrischen Komplexes von His-Cdk9 und Cyclin T1. B: LC-ESI-MS des mit TEV-Protease verdauten P-TEFb Komplexes. Das ermittelte Molekulargewicht von Cyclin T1 entspricht der berechneten Masse. Für Cdk9 wurde eine Massenzunahme von 80 Da beobachtet, die der Mono-Phosphorylierung des Proteins zuzuschreiben ist. C: Elutionsprofil des P-TEFb Komplexes von einer analytischen Superdex 200 10/300 Säule unter Verwendung eines Puffers mit 50 mM Hepes pH 7,5, 350 mM NaCl, 5% Glycerol und 5 mM β -ME.

Zusätzlich zu der bisher dargestellten Reinigungsstrategie erfolgte eine Coexpression von P-TEFb in *Sf21* Zellen. Aufgrund sogenannter *Disorder*-Analysen mittels des RONN-Servers (<http://www.strubi.ox.ac.uk/RONN>), welche für die C-terminalen 32 Aminosäuren von Cdk9 das Fehlen einer Sekundärstruktur vorhersagen, wurde ein um diese Aminosäuren verkürztes Cdk9 Konstrukt 1-340 generiert. Außerdem wurde ein Cyclin T1 Konstrukt geschaffen, das für ein Protein mit einem nicht abschneidbaren, C-terminalen Hexahistidinanker codierte. Dieses Konstrukt wurde zusammen mit Cdk9 1-340 in zwei unterschiedliche *multiple-cloning-sites* des bicistronischen Vektors pFastBacDual kloniert. Durch die Deletion des C-Terminus von Cdk9 und die schon in den Zellen stattfindende Komplexbildung wurde erhofft, die Löslichkeit und die Ausbeute des Komplexes erhöhen zu können. Die Reinigung erfolgte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie als ersten Reinigungsschritt. Dabei wurde jedoch kein stöchiometrischer Komplex erhalten, vielmehr lag Cdk9 im deutlichen Überschuss zu His-Cyclin T1 vor. Durch eine präparative Größenausschlusschromatographie konnte ein 1:1 Komplex formiert werden, der eine Reinheit von über 95% aufwies (Abbildung 29). Die Coexpression von Cdk9 und Cyclin T1 im Baculovirus-Expressionssystem führte jedoch weder zu einer Erhöhung der Ausbeute noch zu einer verbesserten Löslichkeit des Komplexes.

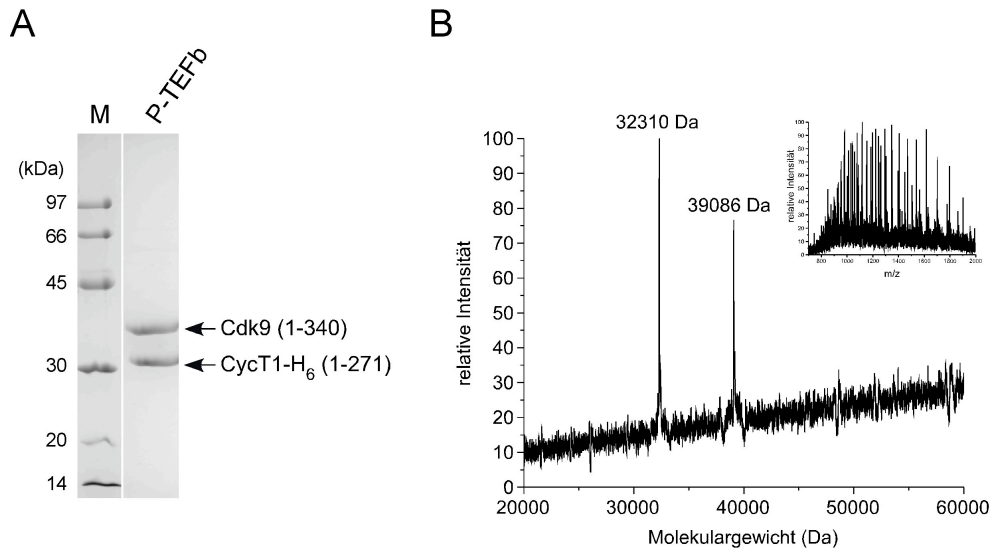


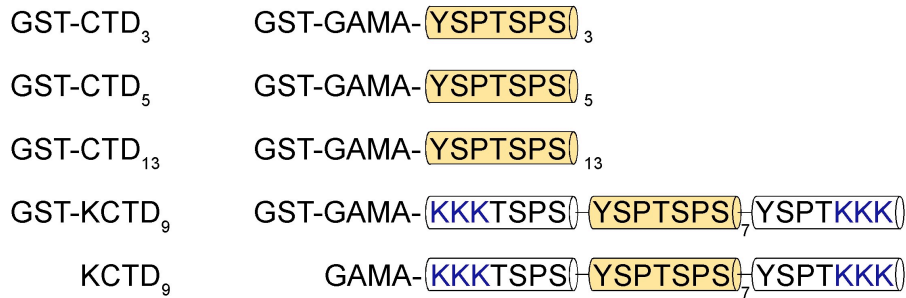
Abbildung 29: Reinheit und Molekulargewicht des aus *Sf21* Zellen isolierten P-TEFb Komplexes. A: SDS-PAGE des Komplexes aus Cdk9 1-340 und Cyclin T1-H₆ 1-271. B: LC-ESI-MS von P-TEFb.

Die Molekulargewichte der Proteine wurden mittels LC-ESI-MS überprüft. Für Cyclin T1-H₆ wurde ein Molekulargewicht von 32310,0 Da (theoretische Masse: 32262,7 Da) ermittelt, für Cdk9 beträgt das ermittelte Molekulargewicht 39086,0 Da (theoretische Masse ohne Phosphorylierung: 39090,5 Da).

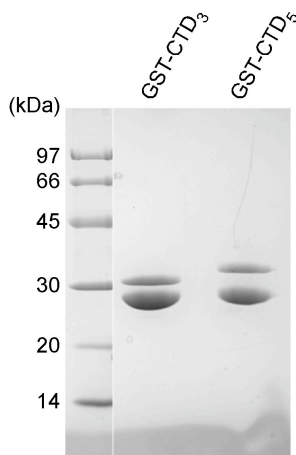
4.3.2 Darstellung von RNA-Polymerase II CTD Konstrukten

Die C-terminale Domäne der RNA-Pol II mit ihren 52 Wiederholungen der Heptadsequenz YSPTSPS stellt das natürliche Substrat des Cdk9-Cyclin T1 Heterokomplexes dar. Für die Studien zur P-TEFb Kinaseaktivität wurden in dieser Arbeit aus synthetischen Oligonukleotiden CTD-Konstrukte mit drei, fünf, neun und dreizehn Heptadwiederholungen generiert und in den Vektor pGEX-4T1TEV kloniert. Die Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte in BL21(DE3)RP Zellen. Bei den nachfolgenden Proteinreinigungen wurde ein hoher Anteil an freiem GST beobachtet, der durch Größenausschlusschromatographie zum Teil abgetrennt werden konnte. Weiterhin wurden Substrate hergestellt, die Lysine an den ersten drei Positionen des ersten und an den letzten drei Positionen des letzten Heptads aufwiesen (KCTD). Diese Mutationen wurden im Hinblick auf eine spätere Verwendung in einem radioaktiven Filterbindungsassay generiert, in welchem das Vorhandensein positiver Ladungen für die Bindung der Proteine an das verwendete Phosphocellulosepapier wichtig ist (Hastie et al., 2006). Die Lysin-enthaltenden Proteine konnten in bedeutend höherer Reinheit und Ausbeute als die wt CTD-Substrate dargestellt werden. CTD-Proteine ohne GST-Anker wurden durch proteolytischen Verdau mittels TEV-Protease und anschließender Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer analytischen Superdex 200 16/60 Gelfiltrationssäule erhalten (Abbildung 30).

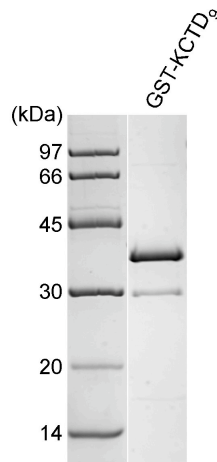
A



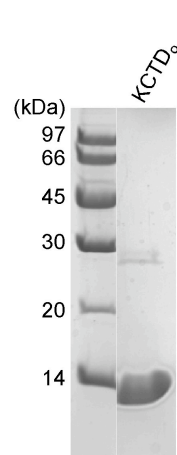
B



C



D



E

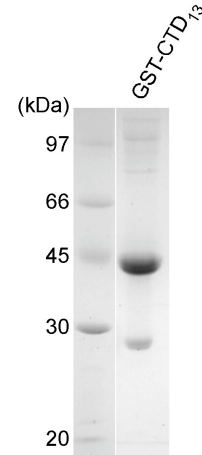


Abbildung 30: A: Schematische Darstellung der CTD-Proteine. B: SDS-PAGE der gereinigten CTD-Proteine (Coomassie-Färbung). Die Anzahl der Heptadwiederholungen wird durch die tiefgestellte Zahl angegeben. B und E stellen wt-CTD Proteine dar, während die Proteine in C und D Lysine an den ersten und letzten drei Aminosäuren anstelle der Konsensusaminosäuren des Heptads enthalten. Letztere Substrate werden hier als KCTD bezeichnet. Eine starke Verunreinigung mit freiem GST (Bande bei 27 kDa) ist vor allem für die Fusionsproteine aus GST und drei bzw. fünf Heptaden zu beobachten.

4.3.3 Phosphorylierung der CTD-Proteine durch P-TEFb

Zunächst wurde untersucht, ob die dargestellten CTD-Konstrukte von P-TEFb *in vitro* phosphoryliert werden können. Zu diesem Zweck wurde ein Kinaseansatz durchgeführt, in welchem typischerweise 100-200 μM der CTD-Proteine mit einem Überschuss ATP und katalytischen Mengen P-TEFb in einem Mg^{2+} -haltigen Puffer bei 30°C inkubiert wurden. Dem Ansatz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe des Cdk9-Inhibitors Flavopiridol gestoppt (Chao and Price, 2001). Die Analyse des Phosphorylierungszustandes der CTD-Konstrukte erfolgte mittels LC-ESI-MS. Im Falle einer einfachen Phosphorylierung sollte eine Zunahme des Molekulargewichts der CTD von 80 Da (PO_3^{2-}) gemessen werden. Abbildung 31 stellt vier dekonvolutierte Massenspektren sowie die dazugehörigen m/z-Spektren eines solchen Ansatzes dar. Als Substrat wurde ein neun Heptadwiederholungen langes KCTD-Protein (Spektren A-C) sowie das entsprechende GST-Fusionsprotein (Spektrum D) eingesetzt. Diese Proteine besitzen acht Ser2, welche als mögliche Phosphorylierungsstellen der Kinase Cdk9 beschrieben worden sind.

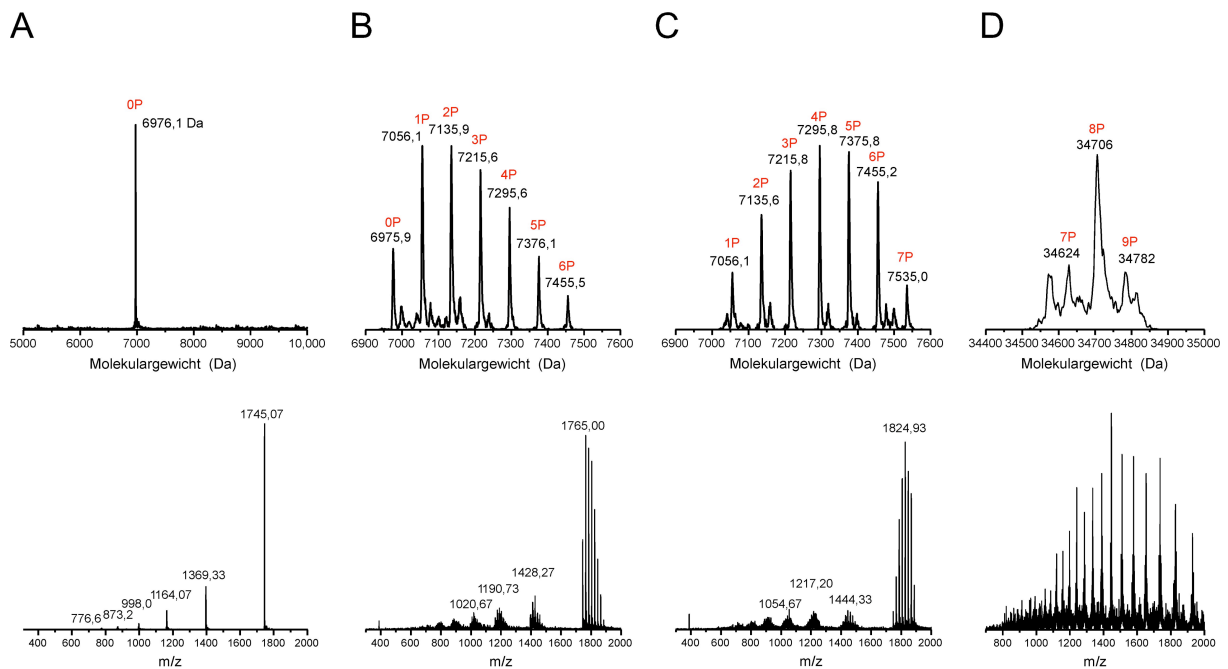


Abbildung 31: LC-ESI-MS Spektren eines Phosphorylierungsansatzes mit einer neun Heptad-langen KCTD (A-C) sowie eines GST-KCTD Fusionsproteins gleicher Heptadanzahl (D). Die dekonvolutierte Massenspektren (obere Reihe) und m/z -Spektren (untere Reihe) zeigen unterschiedliche Phosphorylierungszustände der CTD-Proteine. Die roten Zahlen über den Molekulargewichten geben an, wie häufig die Proteine von P-TEFb (Cdk9 fl-Cyclin T1 1-272) phosphoryliert wurden.

Anhand der Massenspektren ist deutlich zu erkennen, dass die verwendeten CTD-Proteine mehrfach phosphoryliert wurden und somit als Substrat von P-TEFb dienten. Für das nichtphosphorylierte KCTD Protein mit neun Heptadwiederholungen wurde ein Molekulargewicht von 6976,1 Da gemessen, das fast genau mit dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht von 6976,5 Da übereinstimmt (A). Nach Inkubation dieses Peptids für eine Stunde in Gegenwart von 2 mM ATP konnten neben der Masse des nicht-modifizierten Proteins sechs weitere Massen detektiert werden, die sich jeweils um ca. 80 Da voneinander unterschieden und die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände des Proteins angeben (B). Nach einer weiteren Stunde wurde ein zu höheren Molekulargewichten verschobenes Spektrum erhalten, das die Anwesenheit eines bis zu siebenfach phosphorylierten CTD-Peptids zeigte. Die Masse des unmodifizierten Peptids konnte nicht mehr detektiert werden (C). Für das GST-Fusionsprotein konnten über Nacht in Anwesenheit von 1 mM ATP bis zu neun Phosphorylierungen gemessen werden, der Hauptpeak des Spektrums entsprach jedoch dem achtfach phosphorylierten Protein und somit der Anzahl aller vorhandenen Serin2 (D). Bei der Betrachtung der ESI-Spektren im Teil B und C der Abbildung fällt vor allem die unsymmetrische Verteilung der verschiedenen Phosphorylierungszustände auf. Das Integral eines Peaks im ESI-Massenspektrum ist typischerweise kein Maß für die Intensität der Probe, hier handelt es sich jedoch um unterschiedlich modifizierte Zustände eines Proteins.

Die Phosphorylierung des GST-KCTD₉ Fusionsproteins konnte ebenfalls durch SDS-Gelelektrophorese gezeigt werden. Dazu wurden Proben eines Kinaseansatzes auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine durch Coomassie-Färbung visualisiert. Obwohl die Zunahme des Molekulargewichtes mit 80 Da pro Phosphorylierung im Verhältnis zum Gesamtgewicht des Proteins sehr gering ist, konnten im Gel diskrete Banden mit

verringertes Mobilität als das nicht-modifizierte Protein beobachtet werden (Abbildung 32). Dieser Laufunterschied lässt sich auf die starke Ladungsänderung des Proteins bei Einbringen der PO_3^{2-} -Gruppe zurückzuführen. Eindeutig ist zu erkennen, dass mit ansteigender Reaktionszeit die Anzahl der Banden zunächst zunimmt, bis diese schließlich in eine Bande übergehen. Für GST konnte keine Phosphorylierung beobachtet werden, somit ist die Phosphorylierung für die CTD-Sequenz spezifisch.

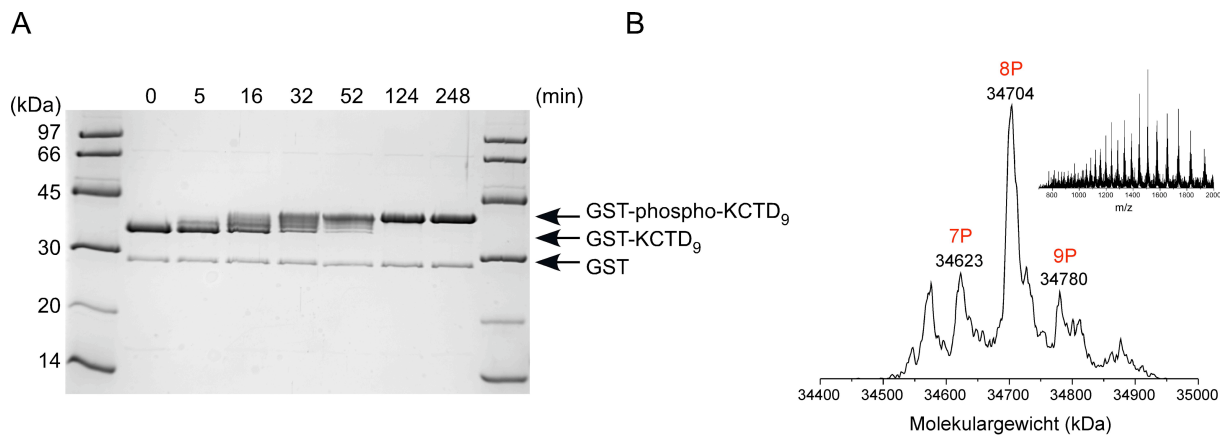


Abbildung 32: Phosphorylierung der GST-KCTD₉ durch P-TEFb. A: 15%ige SDS-Page mit zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben eines Phosphorylierungsansatzes unter Verwendung von 0,1 μM P-TEFb, 100 μM CTD-Substrat und 3 mM ATP bei 30°C. B: LC-ESI-MS der Probe aus A nach einer Inkubationszeit von vier Stunden.

Sowohl die durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen als auch die SDS-PAGE Analysen deuten darauf hin, dass P-TEFb eine definierte Anzahl von Aminosäuren in den CTD-Substraten phosphoryliert. Da die Anzahl der gefundenen Phosphorylierungen der Zahl der vorhandenen Serin2 der Heptade entspricht, wird vermutet, dass jedes Heptad einmal an dieser Aminosäure phosphoryliert wird. Die Frage, ob es sich bei der Phosphoakzeptoraminosäure jedoch ausschließlich um Serin2 handelte, oder ob womöglich auch Serin5 der Heptadwiederholungen phosphoryliert wurden, konnte mit diesem Ansatz nicht beantwortet werden.

4.3.4 Untersuchung der Kinaseaktivität von P-TEFb

Die Fragestellung, wie Hexim1 als Inhibitor der Kinaseaktivität von P-TEFb wirkt, war ein Hauptthema dieser Arbeit. Zu diesem Zweck wurde eine Methode benötigt, die eine quantitative Untersuchung der Kinaseaktivität von P-TEFb bei zugleich geringem Materialaufwand erlaubte. In dieser Arbeit wurde ein radioaktiver Filterbindungsansatz etabliert, mit dem die P-TEFb vermittelte Phosphorylierung von GST-CTD Substraten unter Verwendung von ATP und geringen Mengen $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ untersucht wurde. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt und die Inkorporation der radioaktiven Phosphatgruppe in die CTD wurde durch Szintillationsmessung in Werten von cpm (*counts per minute*) bestimmt. In einem ersten Experiment sollte zunächst die optimale P-TEFb Konzentration für die folgenden Untersuchungen ermittelt werden. Für eine genaue Quantifizierung der Daten sollte die Kinaseaktivität linear in Bezug auf die Enzymkonzentration sein und sich die Werte des nichtinhibierten Ansatzes mindestens um den

Faktor 5 von den Kontrollansätzen (CTD + ATP) unterscheiden. Das Diagramm in Abbildung 33 A zeigt, dass sich die mit ansteigenden P-TEFb Konzentrationen erhaltenen Werte linear zu den eingesetzten Konzentrationen verhielten. Bei einer P-TEFb Konzentration von 0,1 μM wurde ein 15-facher Unterschied zwischen den erhaltenen Werten des P-TEFb Ansatzes und der Kontrolle beobachtet, diese Konzentration wurde in den folgenden Experimenten eingestellt. Als Substrat wurden 100 μM GST-KCTD mit neun Heptadwiederholungen 100 μM ATP eingesetzt. Die spezifische Aktivität des Enzyms (Cdk9 fl-CycT1 1-272) wurde unter diesen Bedingungen zu 125 pmol/min $\cdot\mu\text{g}$ bestimmt. Dieser Wert ähnelt dem kommerziell, erhältlicher P-TEFb Komplexe, die das Vollängen Cyclin T1 enthalten. In einem weiteren Versuch wurde der Verlauf der Phosphorylierung von 10 μM GST-CTD₁₃ unter Verwendung von 300 μM ATP verfolgt. Die Auftragung der gemessenen cpm-Werte gegen die entsprechende Zeit führte zu einem hyperbolischen Kurvenverlauf (Abbildung 33 B). Derselbe Ansatz wurde ebenfalls unter nicht radioaktiven Bedingungen durchgeführt und die Probe nach fünf Stunden mittels LC-ESI-MS untersucht. Dabei konnten bis zu 12 Phosphorylierungen für die CTD detektiert werden. Unter den gegebenen Bedingungen scheint somit ein Endpunkt der Phosphorylierung erreicht worden zu sein, ähnlich wie es zuvor in den massenspektrometrischen Studien beobachtet wurde.

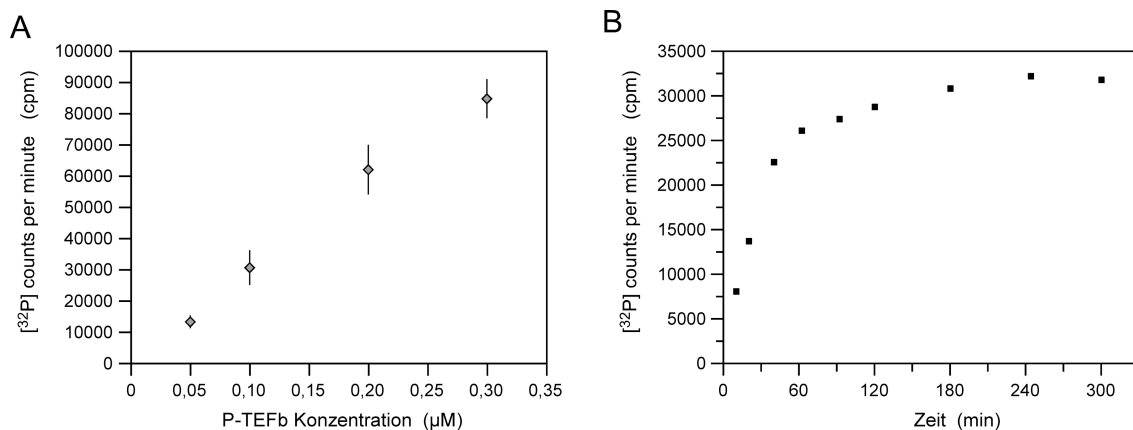


Abbildung 33: Aktivität des P-TEFb Komplexes auf die GST-CTD. A: Phosphorylierung der GST-KCTD₉ in Abhängigkeit der P-TEFb Konzentration. B: Zeitverlauf der Phosphorylierung einer dreizehn Heptad langen GST-CTD unter Verwendung von 0,1 μM P-TEFb, 10 μM Substrat und 300 μM ATP. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt.

4.3.5 Inhibition von P-TEFb durch Hexim1

Als nächstes wurde der Einfluss von Hexim1 fl, des Hexim1-7SK RNA Komplexes und eines N-terminal verkürzten Hexim1 200-359 auf die Kinaseaktivität von P-TEFb untersucht. Hierfür wurde das 66-mer 7SK RNA Konstrukt verwendet, welches für die Hexim-Bindung ausreichend ist. Ansteigende Mengen der Proteine sowie des Protein-RNA Komplexes wurden in radioaktiven Ansätzen eingesetzt und die relative P-TEFb Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass der Hexim1-7SK RNA Komplex eine stärkere Inhibition der Kinase hervorrief als äquimolare Konzentrationen von Hexim1 200-359 oder Hexim1 fl alleine. Das verkürzte Protein wies zudem eine stärkere inhibitorische Wirkung als Vollängen Hexim1 auf. Unter Verwendung einer vier-Parameter-Gleichung und des Programms Grafit5 wurden die Hexim1

Konzentrationen ermittelt, die zu einer 50%igen Inhibition der P-TEFb Kinaseaktivität führten, diese Werte entsprechen den IC_{50} -Werten. Für Hexim1 fl wurde ein Wert von $0,3 \mu\text{M}$ und für den Hexim1-7SK Komplex ein Wert von $0,06 \mu\text{M}$ ermittelt. Allerdings ist die Kurvenanpassung an die Hexim1-7SK RNA Messdaten aufgrund fehlender Messwerte unzureichend. Dies gilt ebenfalls für die Messung mit Hexim1 200-359, bei der ein Wert von $0,07 \mu\text{M}$ erhalten wurde.

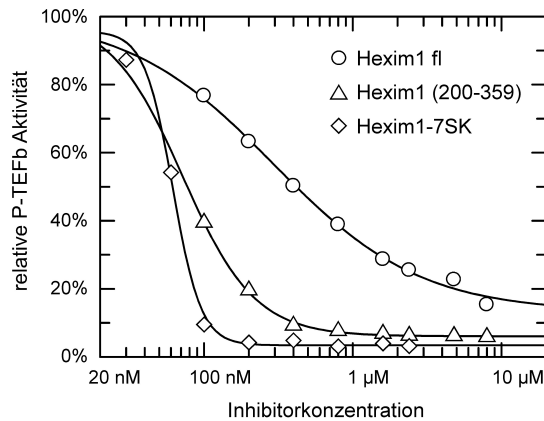


Abbildung 34: Inhibition der Kinaseaktivität von P-TEFb durch Hexim1-7SK RNA. Ansteigende Konzentrationen der Hexim1 Proteine bzw. des Hexim1-7SK RNA Komplexes wurden mit $0,1 \mu\text{M}$ P-TEFb inkubiert und die relative Kinaseaktivität bestimmt. Durch Kurvenanpassung an eine vier Parameter-Gleichung wurde die Konzentration ermittelt, bei der die P-TEFb Aktivität 50% der nichtinhibierten Probe betrug.

Obwohl Hexim1 schon 2004 als Inhibitor von P-TEFb identifiziert wurde, sind die molekularen Mechanismen, die zur Inhibition der Kinaseaktivität führen, weitestgehend unbekannt. Während Vollängen Hexim1 die Assoziation mit der 7SK RNA erfordert, inhibiert Hexim1 181-359 unabhängig von der RNA die P-TEFb Kinaseaktivität (Michels et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Hexim1 Proteine und Mutanten generiert und deren Einfluss auf die P-TEFb Kinaseaktivität mittels des beschriebenen Radioaktivassays untersucht. Hierfür wurden die entsprechenden Hexim1 Proteine zunächst einige Minuten bei Raumtemperatur mit P-TEFb inkubiert, bevor die Kinasereaktion durch Zugabe von ATP initiiert wurde. Die Konzentration der Hexim1 Proteine betrug $2,5 \mu\text{M}$, P-TEFb wurde in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ eingesetzt.

Zunächst wurde Hexim1 fl sowie die Hexim1-TBD untersucht (Abbildung 35 A). Während die TBD keinen Einfluss auf die Cdk9 Aktivität ausübte (97% Aktivität), konnte für Hexim1 fl eine Abnahme der P-TEFb Aktivität auf 28% relativ zu der nichtinhibierten Aktivität beobachtet werden. Das um die TBD C-terminal deletierte Hexim1 Konstrukt 1-254 hatte ebenso wie die TBD alleine keinen Einfluss auf die Cdk9 Aktivität. Durch einen Vergleich mit bekannten zellulären Cdk-Inhibitoren wurde vermutet, dass Hexim ähnlich der Familie der Kip-Inhibitoren wirken könnte (Kapitel 2.4.2). $p27^{Kip1}$ bindet die Cyclin-Untereinheit des Cdk2-CycA Komplexes über sein RxL-Motiv und inhibiert die Cdk2 Kinaseaktivität durch Insertion eines konservierten Tyrosinrestes in die ATP-Bindungsstelle der Kinase (Pavletich, 1999). Hexim1 besitzt zwar kein RxL-Motiv, jedoch wurde von unserer Gruppe die C-terminale *coiled-coil* Region als Bindungsmotiv für das Cyclin identifiziert. N-terminal der TBD besitzt Hexim1 im Bereich von Aminosäure 164 bis 254 mehrere Tyrosine, die entsprechend des oben erwähnten Tyrosins von $p27^{Kip1}$ Cdk9 inhibieren könnten. Ausgehend von der Hexim1-TBD wurden deshalb N-terminal verlängerte Proteinfragmente erzeugt, die je ein

zusätzliches Tyrosin enthielten (Abbildung 35 A, Zeile 5-7). Während die beiden Proteine Hexim1 164-359 und Hexim1 194-359 in der Lage sind, P-TEFb zu inhibieren, wies Hexim1 207-359 eine stark verminderte Fähigkeit zur Inhibition auf. Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Beteiligung der Aminosäuren 194-207 an der Inhibition der Kinaseaktivität hin. In diesem Bereich befindet sich das evolutionär hochkonservierte PYNT-Motiv (Position 202-205) (Michels et al., 2003), dessen Bedeutung für die Hexim1-Inhibitionseigenschaften durch anschließende Mutationsanalyse untersucht werden sollte. Hierfür wurden sowohl Y203, das vollständige PYNT-Motiv, als auch T205 in Hexim1 194-359 zu Glycin mutiert. Abbildung 35 B zeigt, dass das Protein mit einer vollständigen Mutation des PYNT-Motivs nicht mehr zur Inhibition befähigt war. Die P-TEFb Kinaseaktivität in Anwesenheit dieses Proteins entsprach mit 90% fast der des nichtinhibierten Ansatzes (Positivkontrolle). Allerdings konnte für die Mutante Hexim1 Y203G immer noch eine Inhibition beobachtet werden (28% Aktivität) und die Mutation von Y203W resultierte in einem Protein, das Inhibitionseigenschaften vergleichbar mit denen des Wildtyp-Proteins aufwies (12% Aktivität). Während der Effekt der Tyrosinmutation verhältnismäßig gering war, führte die Mutation des Threonins 205 zu Glycin zu einem deutlichen Verlust der Hexim1 inhibitorischen Wirkung. In Anwesenheit dieser Mutante betrug die Kinaseaktivität 88% der Positivkontrolle. Ein weiter N-terminal verkürztes Hexim1 200-359, das unmittelbar vor dem PYNT-Motiv beginnt, wies sogar eine leicht verbesserte Inhibitionswirkung verglichen zu Hexim1 194-359 auf (6% Aktivität). Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hexim1 für seine Aktivität als Kinaseinhibitor sowohl die TBD als auch das hochkonservierte PYNT-Motiv benötigt. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die beiden N-terminal deletierten Proteine Hexim1 194-359 und Hexim1 200-359 einen stärkeren inhibitorischen Effekt als das Vollängen Hexim1 Protein aufwiesen.

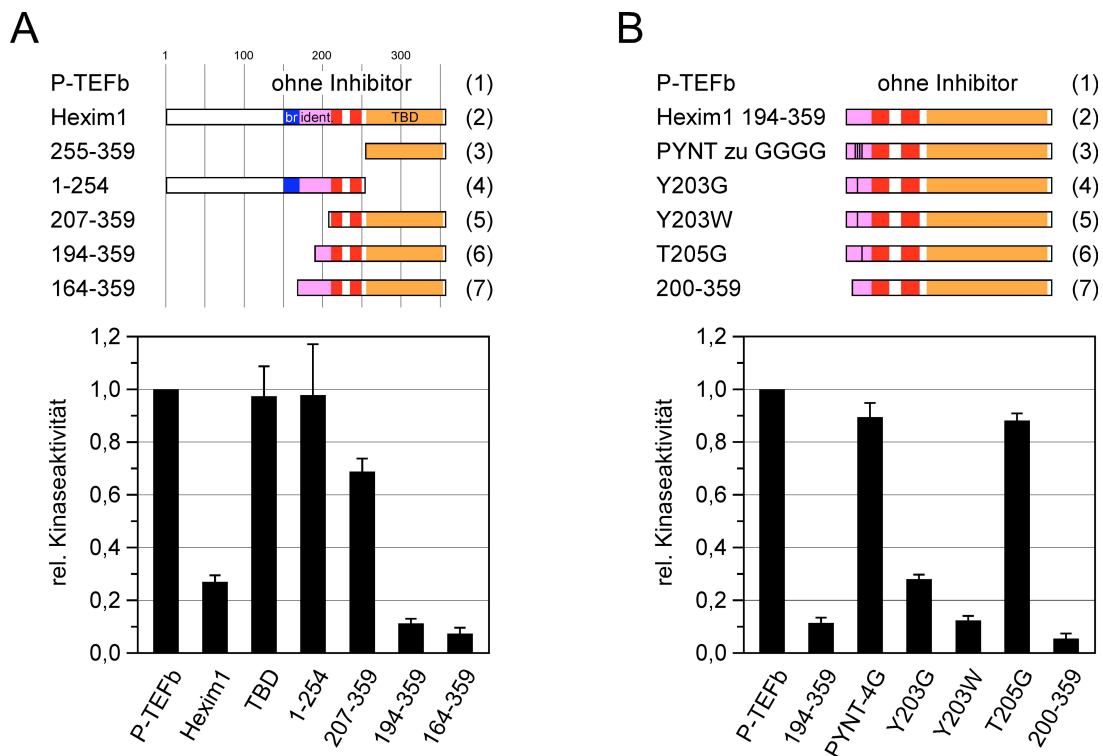


Abbildung 35: Inhibition von P-TEFb durch Hexim1. A: Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften verschiedener N- und C-terminal deletierter Hexim1 Proteine auf die Kinaseaktivität von P-TEFb. B: Einfluss von Mutationen im PYNT-Motiv auf die Aktivität von Hexim1 194-359 als Kinaseinhibitor.

In einer weiteren Experimentserie wurde deshalb der Einfluss der 7SK RNA auf die Hexim1 vermittelte P-TEFb Inhibition untersucht. Die Addition der 66-mer Haarnadelschleife der 7SK RNA zu dem Hexim1 fl Protein erhöhte den inhibitorischen Effekt von Hexim stark (3% Aktivität). Die hier ermittelten Werte glichen denen, die in Anwesenheit des Cdk-Inhibitors Flavopiridol erhalten wurden. Der Komplex aus Hexim1 und 7SK RNA war zudem noch wirksamer als die N-terminal verkürzten Hexim1 Proteine. Die 7SK RNA alleine hatte jedoch keinen Einfluss auf die P-TEFb Aktivität.

Die in diesem Assay durchgeführten Kontrollexperimente sind in Abbildung 36 B zusammengefasst. Da die CTD-Substrate als GST-Fusionsproteine verwendet wurden, wurde ebenfalls eine mögliche Phosphorylierung von GST durch P-TEFb untersucht (siehe Nr. 4). Hier konnten jedoch nur geringe cpm-Werte gemessen werden. DMSO, das als Lösungsmittel für Flavopiridol diente, wurde dem Kinaseansatz in der entsprechenden Konzentration zugefügt, zeigte aber nur einen geringen Einfluss auf die P-TEFb Aktivität. Das Vesikel assoziierte SNARE-Protein Ykt6, das in keinem thematischen Bezug zu den hier untersuchten Proteinen steht, hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität.

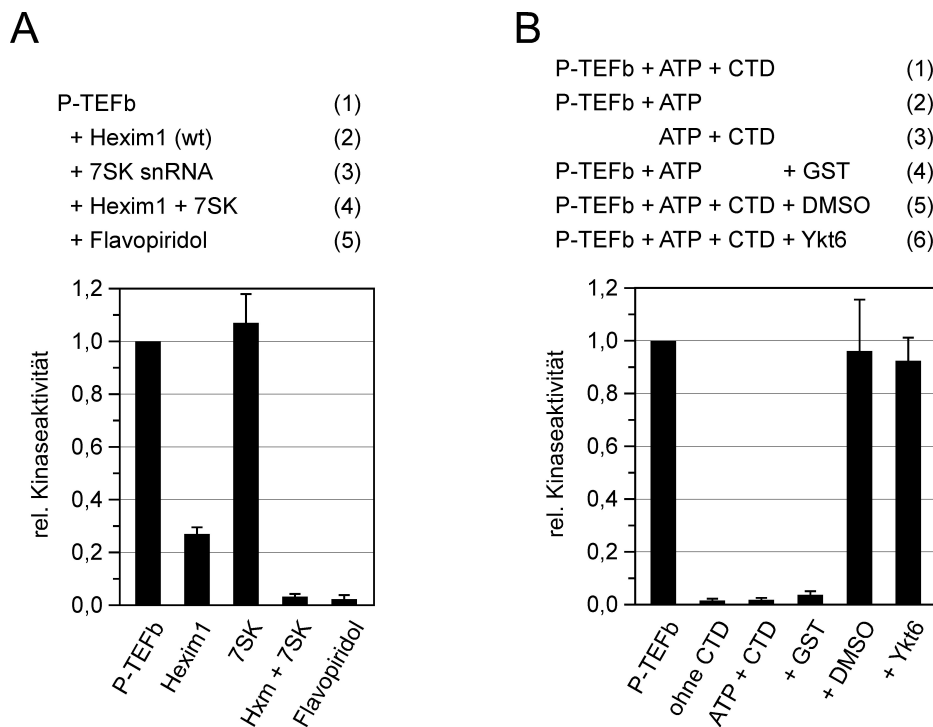


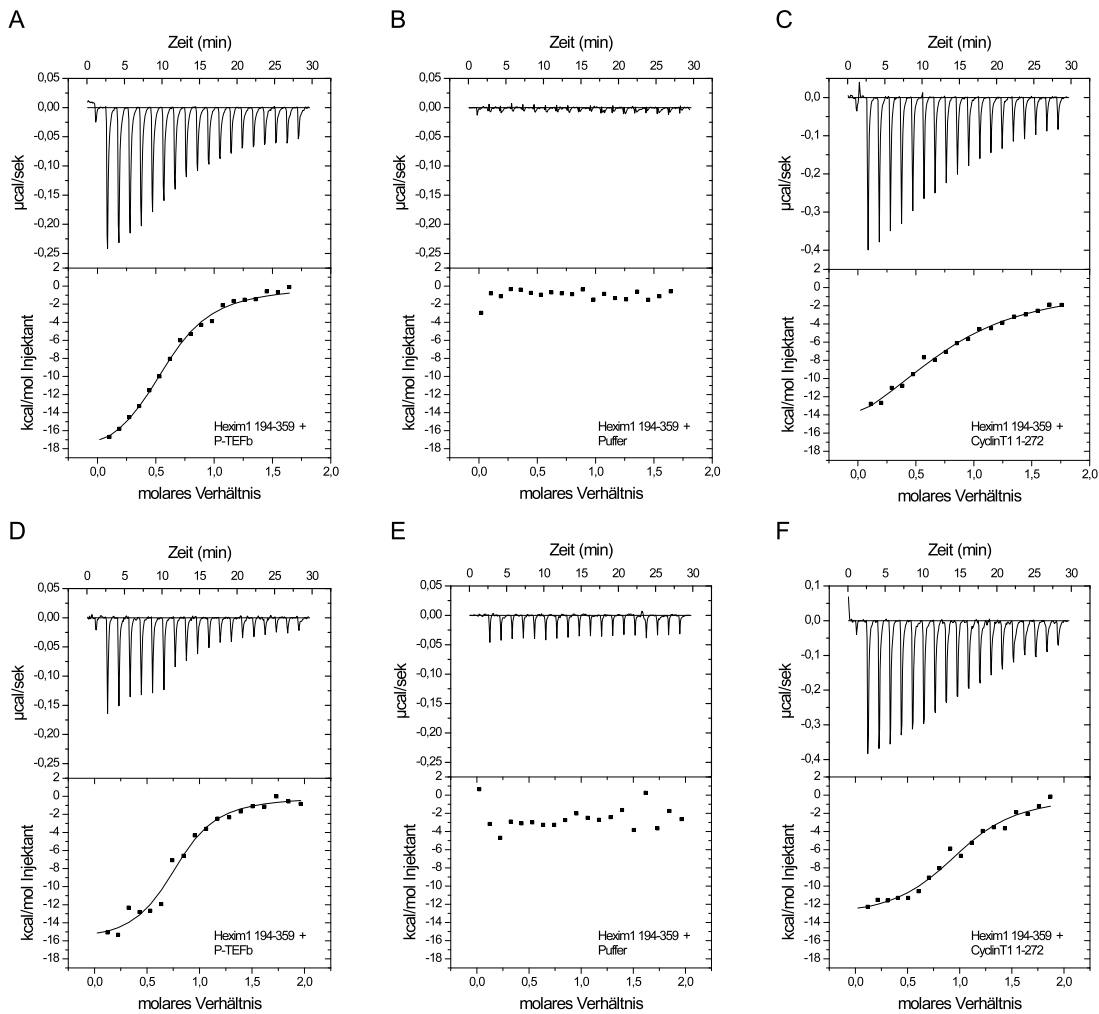
Abbildung 36: Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 und 7SK RNA. A: Einfluss der 7SK RNA auf die Hexim1 vermittelte P-TEFb Inhibition. B: Darstellung der durchgeführten Kontrollexperimente.

4.3.6 Bindungsaffinität zwischen Hexim1 194-359 und P-TEFb

Nachdem in den radioaktiven Kinaseassays gezeigt wurde, dass das Konstrukt Hexim1 194-359 für die Inhibition der Kinaseaktivität ausreichend ist, sollte die Affinität dieses Proteins zu P-TEFb bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde die isotherme Titrationskalorimetrie verwendet, mit welcher die thermodynamischen Parameter einer Interaktion zweier Proteine bestimmt werden können. Aufgrund der geringen molaren Konzentration des P-TEFb Komplexes wurde dieser in die Messzelle eines iTC₂₀₀-Mikrokalorimeters gefüllt und nach Thermostatisierung auf 15°C schrittweise mit dem

zehnfach höher konzentrierten Hexim1 Protein aus der Spritze titriert. Die Proteine waren zuvor in denselben Puffer dialysiert worden, um die Messung von Pufferartefakten auszuschließen. In einer ersten Messreihe unter Verwendung eines Puffers mit 50 mM HEPES pH 7,6, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 5 mM β -ME (Puffer1) wurden 98 μ M Hexim1 in Injektionsschritten von 2 μ l zu 11,5 μ M P-TEFb titriert (Abbildung 37 A). Dabei konnte eine exotherme Reaktion mit einer Wärmeabgabe von -19,7 kcal/mol beobachtet werden. Die Dissoziationskonstante der Bindung wurde zu 1,0 μ M ermittelt. Die entsprechende Kontrollmessung, in der Hexim1 gegen ITC-Puffer titriert wurde, zeigte keine nennenswerte Wärmetönung (Abbildung 37 B). Zum Vergleich wurde unter diesen Bedingungen die Affinität von Hexim1 zu Cyclin T1 untersucht (Abbildung 37 C). Hierfür wurden 192,7 μ M Hexim1 zu einer zehnfach geringer konzentrierten Cyclin T1 Lösung titriert. Es wurde ein K_d Wert von 7,2 μ M erhalten. Hexim1 besitzt somit eine höhere Affinität zum Heterokomplex Cdk9-Cyclin T1 als zu Cyclin T1 alleine. Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Interaktionen von Hexim mit der Kinase Cdk9 zu der Bindung beitragen.

In einer zweiten Serie von ITC-Experimenten wurden die Messungen statt in dem oben genannten Hochsalzpuffer in einem Puffer, der nur 5% Glycerol und 250 mM NaCl enthielt, (Puffer 2) wiederholt. Zunächst wurden 58 μ M Hexim1 gegen eine zehnfach geringer konzentrierte P-TEFb Lösung titriert (Abbildung 37 D). Aus dieser Messung wurde eine Dissoziationskonstante von 0,3 μ M erhalten. Der entsprechende K_d für die Bindung von Hexim1 an Cyclin T1 wurde in einem unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Experiment zu 1,7 μ M bestimmt (Abbildung 37 F). Die Zunahme der Bindungsstärke für Hexim1 und Cyclin T1 durch die Verringerung des Salzgehalts im Puffer war zu erwarten, da die Bindung von einem großen, negativen Ladungsbereich auf dem ersten *coiled-coil* Segment von Hexim1 und positiven Ladungen von Cyclin T1 vermittelt wird (Dames et al., 2007). Eine Aussage über die Stöchiometrie des P-TEFb-Hexim1 Komplexes ist aufgrund der schwankenden Werte von n schwierig.



Titrationsschema	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	K_d (μM)	molares Verhältnis n
Hexim1 zu P-TEFb (P1)	-7,9	-19,7	-11,8	1,0	0,6
Hexim1 zu Cyclin T1 (P1)	-6,8	-19,4	-12,6	7,2	0,8
Hexim1 zu P-TEFb (P2)	-8,5	-16,2	-7,7	0,3	0,8
Hexim1 zu Cyclin T1 (P2)	-7,6	-13,6	-6,0	1,7	1,0

Abbildung 37: ITC-Messungen und thermodynamische Parameter der Interaktionen zwischen Hexim1 194-359 und P-TEFb oder Cyclin T1 1-272. Obere Reihe: Titration von Hexim1 zu P-TEFb (A), Hexim1 in Puffer (B) und Hexim1 zu Cyclin T1 (C). Die Messungen A-C erfolgten in 50 mM Hepes pH 7,6, 500 mM NaCl, 10% Glycerol und 5 mM β -ME (Puffer 1). Untere Reihe: Titrations von Hexim1 zu P-TEFb (D), Hexim1 zu Puffer (E) und Hexim1 zu Cyclin T1 (F) unter Verwendung eines Puffers mit 50 mM Hepes pH 7,6, 250 mM NaCl, 5% Glycerol und 5 mM β -ME (Puffer 2). Die Messungen wurden in einem iTC₂₀₀ Mikrokalorimeter bei 15°C durchgeführt.

4.3.7 Untersuchung der Kinetik der Hexim1-P-TEFb Interaktion

Die Ergebnisse der bisherigen Studie deuten darauf hin, dass ein dualer Bindungs- und Wirkmechanismus bei der Inhibition von P-TEFb durch Hexim vorliegt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die C-terminale *coiled-coil* Region des Proteins für die Bindung an Cyclin T1 und für die Inhibition von P-TEFb in zellulären Experimenten wichtig ist (Schulte et al., 2005). Durch zwei weitere Experimente wurde anschließend untersucht, welchen Einfluss der N-Terminus des inhibierenden Konstruktes Hexim1 194-359 auf die P-TEFb Bindung hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Hexim1 Proteine generiert,

die an Position Cystein198 oder Cystein257 mit dem umgebungssensitiven Farbstoff 1,5-IAEDANS markiert wurden. Cystein257 befindet sich in unmittelbarer Nähe der TBD und eine Fluoreszenzmarkierung dieser Position wurde erfolgreich für Bindungsanalysen zwischen der Hexim1-TBD mit Cyclin T1 eingesetzt (Dames et al., 2007; Schulte et al., 2005). Cystein198 liegt hingegen in der Nähe des PYNT-Motivs, von dem gezeigt wurde, dass dieses an der Inhibition der Kinase beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden für die beiden Positionen verschiedene Assoziationskinetiken bei der Bindung an P-TEFb vermutet. In einer *Stopped-Flow* Apparatur wurde nach einem schnellen Durchmischen von 62,5 nM fluoreszenzmarkiertem Hexim1 mit ansteigenden Konzentrationen von P-TEFb die Änderung des Fluoreszenzsignals über eine Zeit von 5 s verfolgt. Die Dansylgruppe wurde bei 336 nm angeregt und die Emission unter Verwendung eines 420 nm *cut-off* Filters gemessen. Abbildung 38 zeigt das Fluoreszenzsignal, das nach Mischen unterschiedlicher Konzentrationen P-TEFb mit Hexim1 G257C-EDANS (A) und Hexim1 Q198C-EDANS (B) erhalten wurde.

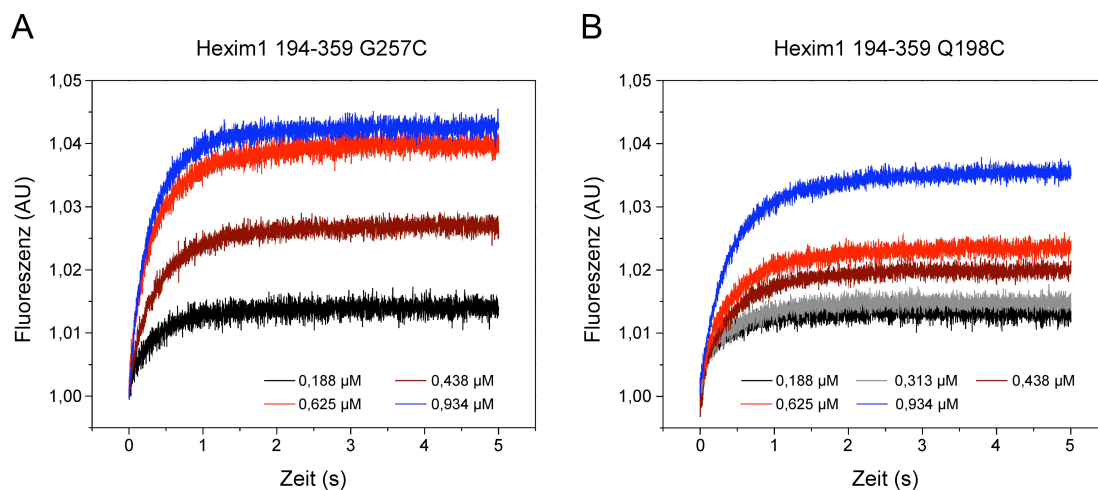
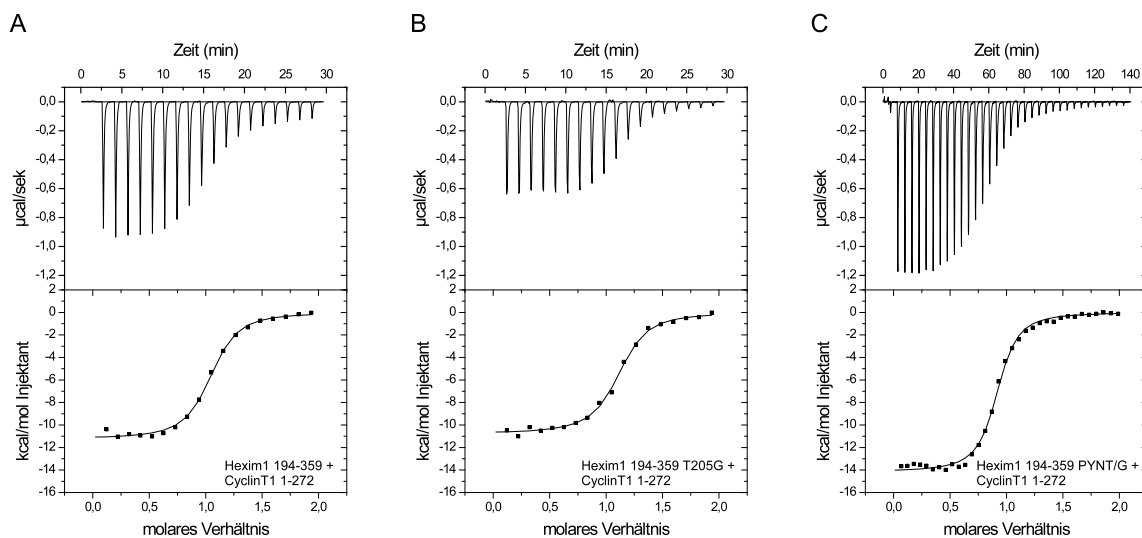


Abbildung 38: Assoziationskurven von P-TEFb an fluoreszenzmarkiertem Hexim1 G257C (A) und Q198C (B). Hexim1 wurde in einer finalen Konzentration von 62,5 nM eingesetzt und mit einem Überschuss P-TEFb vermischt. Die eingesetzten P-TEFb Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 25°C in 50 mM HEPES pH 7,5, 250 mM NaCl, 5% Glycerol und 5 mM β -ME durchgeführt. Die Darstellung der Kurvenverläufe für Hexim1 Q198C ist aufgrund von Signalsprüngen zu Beginn der Messung fehlerbehaftet.

Sowohl für das an Position 198 als auch an Position 257 markierte Hexim Protein wurde nach Mischen mit P-TEFb eine Änderung des Fluoreszenzsignals detektiert. Die erhaltenen Assoziationskurven konnten an eine monoexponentielle Funktion angepasst und hierdurch die beobachteten Ratenkonstanten k_{obs} erhalten werden. Die k_{obs} -Werte wiesen in dem gemessenen Konzentrationsbereich jedoch keine signifikante Abhängigkeit zu der eingesetzten P-TEFb Konzentration auf, sondern betragen für Hexim1 C198 ca. $2,0 \text{ s}^{-1}$ und für Hexim1 G257C ca. $2,6 \text{ s}^{-1}$. Somit konnten unter diesen Bedingungen keine kinetischen Parameter bestimmt werden, die genauere Hinweise auf den Mechanismus der Bindung von Hexim1 an P-TEFb liefern. Zu beachten ist, dass die hier durchgeführten Messungen aufgrund der geringen Konzentration des P-TEFb Komplexes unterhalb des in den ITC-Messungen bestimmten K_d Wertes durchgeführt wurden.

4.3.8 Einfluss des PYNT-Motivs von Hexim1 auf die Bindung an Cyclin T1

Michels *et al.* berichteten, dass Mutationen im konservierten PYNT-Motiv von Hexim die Bindung des Proteins an P-TEFb aufheben (Michels *et al.*, 2004). Eine andere Studie zeigte jedoch, dass die Bindung von Hexim1 an Cyclin T1 allein über die TBD im C-terminalen Bereich 255-359 von Hexim1 vermittelt wird (Schulte *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde ein möglicher Einfluss von Mutationen im PYNT-Motiv auf die Bindung zu Cyclin T1 untersucht. Zu diesem Zweck wurden ITC-Experimente zwischen Hexim 194-359 wt, den Hexim-Mutanten 194-359 PYNT zu G sowie T205G und Cyclin T1 1-272 durchgeführt. Diese sind in Abbildung 39 dargestellt. Für alle Messungen wurde ein Puffer mit 50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl und 0,5 mM TCEP verwendet.



Titrationsschema	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	K_d (μM)	molares Verhältnis n
Hexim1 194-359 zu Cyclin T1	-8,2	-11,2	-3,0	0,5	1,0
Hexim1 194-359 T205G zu Cyclin T1	-8,3	-10,8	-2,5	0,6	1,1
Hexim1 194-359 PYNT/G zu Cyclin T1	-8,7	-14,2	-5,5	0,3	0,9

Abbildung 39: ITC-Messungen und thermodynamische Parameter der Interaktionen zwischen Hexim1 194-359 wt (A), Hexim1 T205G (B) und Hexim1 PYNT/G (C) mit Cyclin T1 1-272. In den Messungen A und B wurden jeweils 0,4 mM Hexim zu 0,04 mM Cyclin T1 titriert, in der Messung C wurden 0,3 mM Hexim zu 0,03 mM Cyclin T1 titriert. Messung C wurde nicht mit einem iTC₂₀₀ Mikrokolorimeter sondern mit einem VP-ITC-Gerät durchgeführt. Die Temperatur betrug in allen Fällen 15°C.

Die Ergebnisse der ITC-Messungen zeigen, dass die Hexim1 Proteine mit Mutationen im PYNT-Motiv eine ähnliche Affinität zu Cyclin T1 1-272 aufwiesen wie das Hexim1 wt Protein. Das PYNT-Motiv hat somit keinen Einfluss auf die Bindung von Hexim1 zu Cyclin T1. Weiterhin fällt auf, dass die Dissoziationskonstante von Hexim1 zu Cyclin T1 in dem verwendeten Puffer mit nur 50 mM Salz niedriger ist (0,5 μM) als in den vorherigen Messungen, in welchen 250 mM (1,7 μM) bzw. 500 mM Salz (7,2 μM) verwendet wurde. Dieses Ergebnis bestätigt die elektrostatische Natur der Hexim1-Cyclin T1 Interaktion. Zusätzlich wurde eine ITC-Messung zwischen P-TEFb und Hexim1 194-359 T205G durchgeführt (Abbildung 50 im Anhang). In dem Kinaseassay konnte gezeigt werden, dass diese Mutante die Inhibition von Cdk9 weitgehend aufhebt. Die Dissoziationskonstante für

die Bindung der Hexim-Mutante an P-TEFb betrug $2,3 \mu\text{M}$ und ist nur geringfügig von dem Wert, der unter gleichen Bedingungen für die Bindung von Hexim1 194-359 wt an Cyclin T1 ermittelt wurde (K_d $1,7 \mu\text{M}$) verschieden. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Interaktion mit Cyclin T1 über die TBD vermittelt wird und das PYNT-Motiv mit Cdk9 interagiert.

4.3.9 Formierung eines minimalen, inhibierten P-TEFb Komplexes

Die in den radioaktiven Kinaseassays erhaltenen Ergebnisse liefern die Grundlage für einen minimalen, inhibierten Komplexes bestehend aus P-TEFb und Hexim1 194-359. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Komplex in Zusammenarbeit mit Janna Bigalke formiert und in kristallographischen Studien eingesetzt.

Für die Komplexformierung wurden resuspendierte *Sf21* Zellen einer P-TEFb Coexpression mit rekombinant in *E.coli* hergestellten Hexim1 194-359 vor dem Zellaufschluss versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie über den C-terminalen Histidin-Anker von Cyclin T1 und anschließender Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Superdex 200 16/60 Säule. Aus einem Liter einer Baculovirus-infizierten *Sf21* Kultur konnten insgesamt 0,7 mg des Komplexes mit einer finalen Konzentration von 3 mg/ml erhalten werden (Abbildung 40). Das Molekulargewicht der Proteine wurde mittels LC-ESI-MS bestätigt. Mit diesem Komplex wurden Kristallisationsansätze im *sitting-drop* Verfahren im 96 *well* Format angefertigt. Schon nach zwei Tagen konnten in Bedingung 30 des JSCGIII *core screens* (Qiagen, 100 mM HEPES pH 7,5, 200 mM CaCl_2 , 18% PEG400) und in Bedingung 57 des JSGC+ *screens* (100 mM MES pH 6.5, 1,6 M CaCl_2) Kristalle beobachtet werden. Versuche, diese Kristalle für die Strukturanalyse des Komplexes in einem größeren Format zu reproduzieren, blieben bisher leider erfolglos.

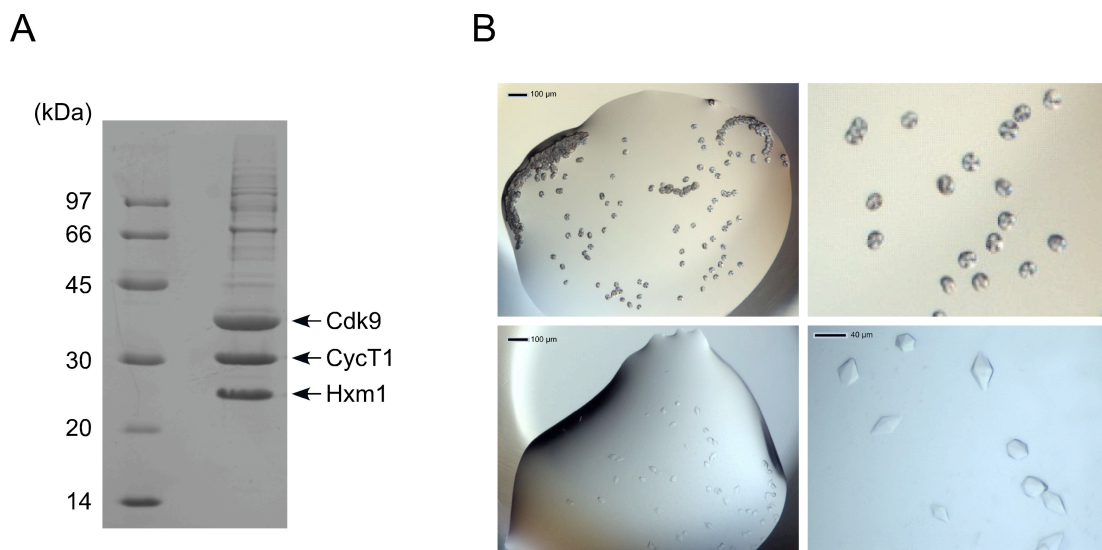


Abbildung 40: Darstellung und Kristallisation des inhibierten P-TEFb Komplexes. A: 15%iges SDS-Gel des gereinigten trimeren Komplexes aus Cdk9 1-340/Cyclin T1 1-272-H₆/Hexim1 194-359. Der Komplex weist Verunreinigungen mit einem Molekulargewicht über 45 kDa auf, die durch die Größenausschlusschromatographie nicht abgetrennt werden konnten. B: Kristalle nach drei Wochen, die unter der Bedingung 57 des JSGC+ *screens* (obere Reihe) und Bedingung 30 des JSCGIII *core screens* (untere Reihe) bei 4°C erhalten wurden.

4.3.10 Konkurrenz von HIV-1 Tat und Hexim1 um die Bindung an Cyclin T1

Neben den Studien, die sich mit der Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 beschäftigten, wurde ebenfalls der Einfluss des viralen Tat Proteins auf den inaktiven P-TEFb Komplex untersucht. HIV-1 Tat stimuliert die Transkription des viralen Genoms durch Rekrutierung von P-TEFb an das HIV-1 LTR (2.6.5). Die Interaktion von Tat mit P-TEFb wird dabei über die Bindung des ARM Motivs von Tat an die erste Cyclin-Box von Cyclin T1 vermittelt (Anand et al., 2008). Auch der Transkriptioninhibitor Hexim1 bindet die Cyclin-Boxen von Cyclin T1 (Schulte et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Bindungsfähigkeiten von Tat und Hexim1 an Cyclin T1 näher untersucht werden. Zunächst wurde ein Fluoreszenz-Kompetitionsexperiment unter Verwendung von 1,5-IAEDANS markierter Hexim1-TBD (Hxm1-TBD*) durchgeführt. In einer *Stopped-Flow* Apparatur wurde eine äquibrierte Lösung aus 5 μM Cyclin T1 1-272 und 5 μM dimerer, fluoreszenzmarkierter Hexim-TBD mit 10 μM (2x) und 20 μM (4x) Tat vermischt und das Fluoreszenzsignal mit einem *cut-off* Filter über 420 nm über eine Zeitdauer von 2s verfolgt. Es konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Signalintensität beobachtet werden, die durch die Zugabe einer äquimolaren Menge TAR-RNA zu Tat noch weiter verstärkt wurde (Abbildung 41). Tat kompetierte somit mit Hexim um die Bindung an Cyclin T1. Die für Tat/TAR (2x) erhaltene Abnahme des Fluoreszenzsignals ist zudem größer als die Abnahme, die bei der Verdrängung von Hxm1-TBD* mit unmarkierter Hexim1-TBD (2x) erhalten wurde. Unter Verwendung des Programms Scientist und des im Anhang dargestellten Modells konnten Assoziations- und Dissoziationsraten der Bindung von Tat an Cyclin T1 erhalten werden. Die Anwesenheit der TAR RNA bedingte eine 1,5 bis 2-fach höhere Assoziationsrate (k_{on}) und eine 2 bis 3-fach niedrigere Dissoziationsrate (k_{off}) als Tat alleine. Insgesamt war die Affinität des Tat-TAR Komplexes an Cyclin T1 verglichen mit der von Tat alleine um den Faktor 5 erhöht. Dies könnte mit der Stabilisierung des rekombinant in *E.coli* hergestellten Tat Proteins durch die TAR RNA erklärt werden.

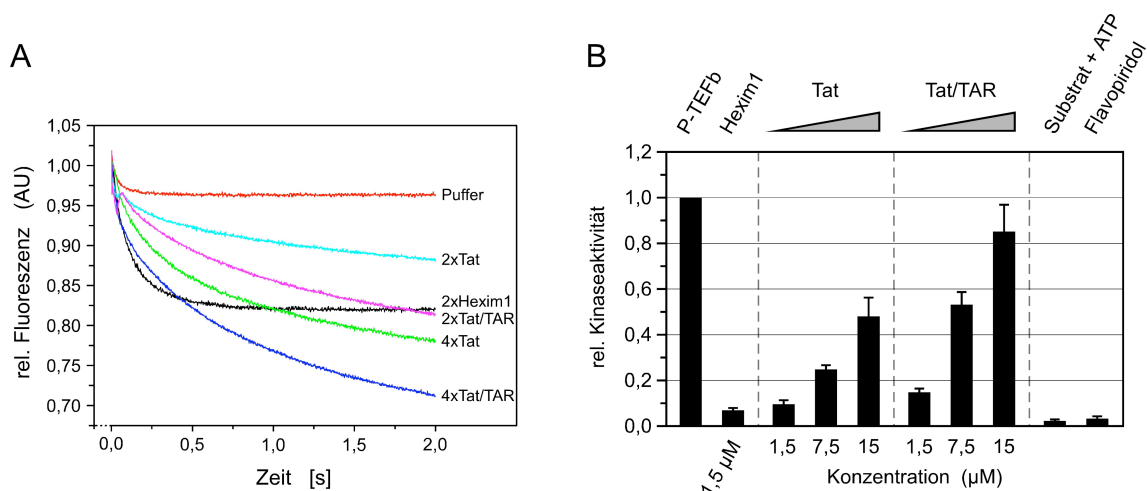


Abbildung 41: Konkurrenz von Tat bzw. des Tat-TAR Komplexes und Hexim1 um die Bindung an Cyclin T1. A: Fluoreszenz-Kompetitionsexperiment mit Hexim1-TBD*, Cyclin T1 und Tat bzw. Tat-TAR. Ein vorgeformter Komplex aus Hexim1-TBD* und Cyclin T1 wurde mit dem angegebenen Überschuss an Tat, Tat-TAR bzw. unmarkierter Hexim1-TBD gemischt und das Fluoreszenzsignal über eine Zeit von 2 s verfolgt. Die Konkurrenz von Tat bzw. unmarkierter TBD mit Hexim1-TBD* führt zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals. B: Einfluss von Tat bzw. Tat-TAR auf die Kinaseaktivität eines inhibierten P-TEFb-Hexim1 Komplexes.

Ergänzend wurde der Einfluss von Tat im funktionalen *in vitro* Assay auf die Kinaseaktivität des inhibierten P-TEFb Komplexes untersucht. Zu einem mit Hexim1 194-359 inhibierten P-TEFb Komplex wurde ein 1-, 5- und 10-facher molarer Überschuss (bezogen auf Hexim1) HIV-1 Tat 1-86 bzw. des vorgeformten Tat-TAR Komplexes hinzugefügt und ein Kinaseassay unter Verwendung von radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Wie in Abbildung 41 B zu erkennen ist, führt die Zugabe von Tat konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität. Dieser Effekt ist in Anwesenheit der TAR-RNA erhöht und es kann eine Rückkehr bis auf 83% der nicht-inhibierten Kinaseaktivität beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Daten der kinetischen Analysen und zeigen, dass Tat durch Konkurrenz mit Hexim1 um die Bindung an Cyclin T1 in der Lage ist, den inaktiven Komplex aufzuheben und die Kinaseaktivität von P-TEFb wiederherzustellen.

4.4 Strukturelle Analyse des zentralen Bereichs von Cyclin T1

Während die Cyclin-Boxen von Cyclin T1 strukturell und funktionell charakterisiert sind, ist bisher wenig über den zentralen und C-terminalen Bereich des 726 aa langen Proteins bekannt. Sekundärstrukturvorhersagen schlagen die Ausbildung eines *coiled-coil* von Position 388 bis 419 vor. Es wurde ferner berichtet, dass eine zentrale Region von Position 481 bis 551, die reich an Histidinen ist, mit der C-terminalen Domäne der RNA-Pol II interagiert (Tauben et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Konstrukte des mittleren Bereichs von Cyclin T1 für strukturelle Studien generiert (Abbildung 42). Zwei dieser Konstrukte enthielten sowohl die putative *coiled-coil* Region als auch die Histidin-reiche Region (Konstrukte M und M2), die anderen beiden lediglich die putativen *coiled-coil* Motive sowie flankierende Reste (Konstrukte M1 und M3).

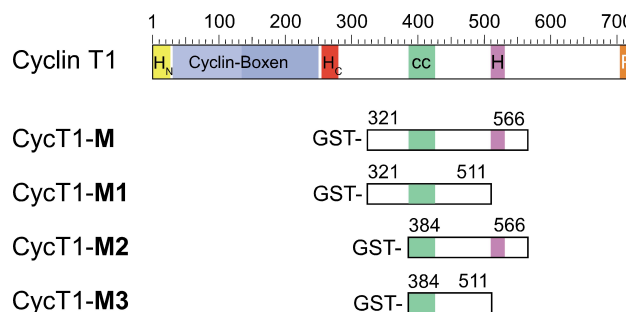


Abbildung 42: Domänenarchitektur von Cyclin T1 1-726 und Darstellung der generierten Cyclin T1 Proteinkonstrukte. Die Cyclin-Boxen (blau), die an der Bindung von Cdk9, Hexim und HIV-1 Tat beteiligt sind, befinden sich im N-terminalen Bereich des Proteins und werden von einer N- und C-terminalen Helix flankiert (gelb und rot). Die Lage der vorhergesagten *coiled-coil* Region ist in grün, des Histidin-reichen Bereichs in violett und der PEST-Sequenz in orange markiert. Die PEST-Sequenz ist mit der Degradation des Proteins assoziiert.

4.4.1 Darstellung der Cyclin T1 Proteine

Die den zentralen Bereich von Cyclin T1 umfassenden Proteine wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und durch GSH-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Der GST-Anker wurde von allen Proteinen durch Verdau mit TEV-Protease entfernt. Für die strukturelle Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie wurden die beiden Konstrukte Cyclin T1 321-566 und Cyclin T1 384-522 als

uniform ^{15}N -markierte Proteine hergestellt. Die Reinheit der Proteine wird in den folgenden SDS-Gelen gezeigt.

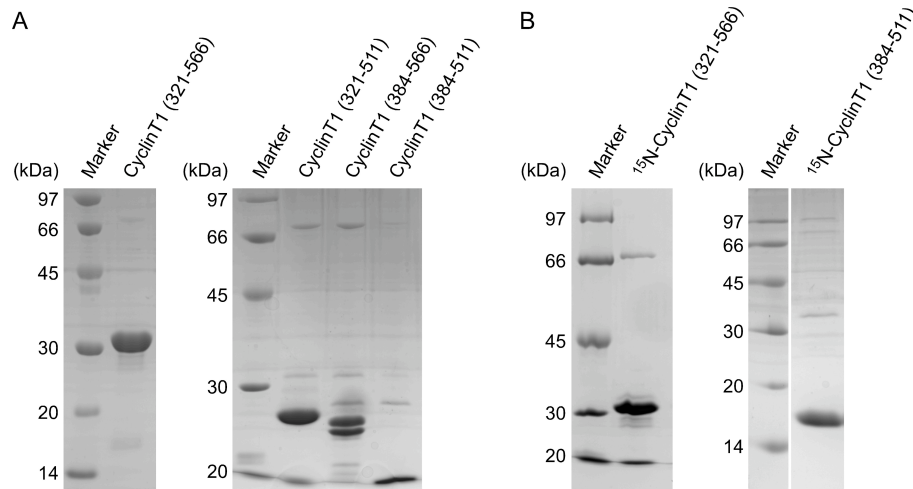


Abbildung 43: SDS-Page der dargestellten Cyclin T1 Proteine. A: Das längste Cyclin T1 Konstrukt 321-566 konnte in hoher Reinheit erhalten werden, die drei Verkürzungen waren leicht verunreinigt. Für Cyclin T1 384-566 konnten nach der Reinigung zwei Banden gleicher Intensität beobachtet werden. B: Reinheit der für die NMR-spektroskopische Analyse gereinigten Cyclin T1 Proteine.

4.4.2 CD- und NMR-Spektroskopie der Cyclin T1 Proteine

Zur Abschätzung des Sekundärstrukturgehaltes wurde Cyclin T1 384-511 zunächst mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 15°C und 25°C sowie den pH Werten pH 6 und pH 8. In Abbildung 44 sind dazugehörigen CD-Spektren in einer Abbildung vergleichend dargestellt. Mit Hilfe des Programms Dichroweb wurde anschließend aus den Kurvenverläufen der CD-Spektren der Sekundärstrukturgehalt des Proteins bestimmt (Whitmore and Wallace, 2004). Exemplarisch wird diese Auswertung für die bei pH 8 und 25°C aufgenommenen Daten im Teil B der Abbildung gezeigt.

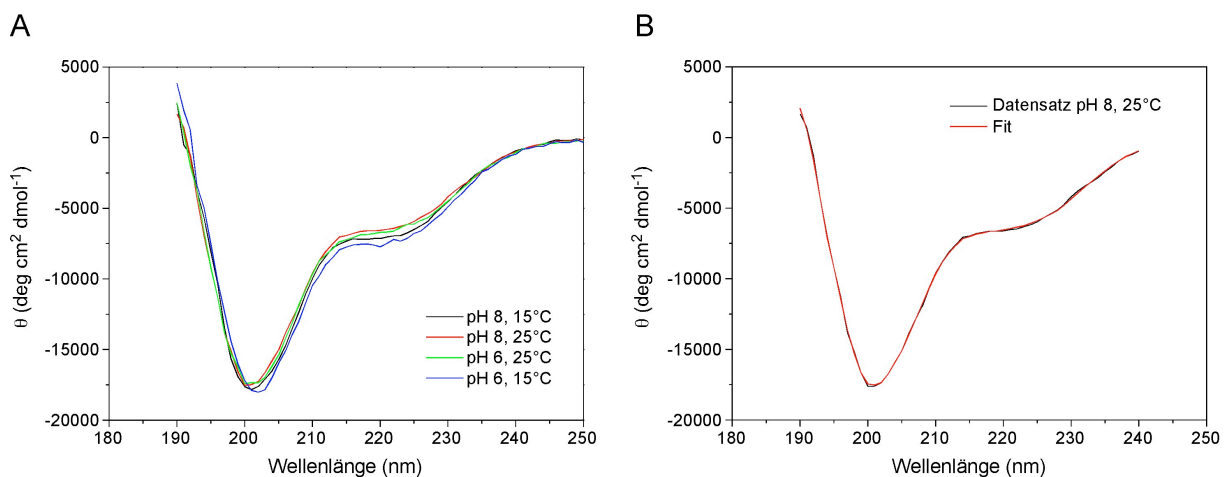


Abbildung 44: CD-Spektroskopie von Cyclin T1 384-511. A: Die bei vier verschiedenen Bedingungen aufgenommenen CD-Spektren weisen einen ähnlichen Kurvenverlauf auf, der einem vorwiegend ungefalteten Protein entspricht. B: Auswertung der Spektren mit dem Programm Dichroweb am Beispiel der Messung bei pH 8 und 25°C . Dargestellt sind die experimentell ermittelten Daten in schwarz sowie der durch das Programm angepasste Kurvenverlauf in rot.

Den Kurvenverläufen der Spektren kann entnommen werden, dass die Proteine überwiegend unstrukturiert vorliegen. Die Änderung des pH-Wertes und der Temperatur hatte keinen Einfluss auf die Faltung des Proteins, da sich die Spektren bei allen Bedingungen weitgehend ähnelten. Der helikale Anteil des Proteins wurde mit Hilfe des Programms Dichroweb zu 15%, der β -Faltblattanteil (*extended*) zu 9% und der Gehalt an Schleifen (*turns*) zu 9% bestimmt. Der überwiegende Teil des Proteins (67%) ist jedoch unstrukturiert. Die entsprechenden Werte für die anderen Bedingungen unterscheiden sich nur geringfügig von den genannten Werten und werden deshalb nicht angegeben.

Zur weiteren strukturbiologischen Untersuchung wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der uniform ^{15}N -markierten Proteine aufgenommen. Die Proteine wurden hierfür in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. In Abbildung 45 sind das HSQC-Spektrum von ^{15}N -Cyclin T1 321-566 bei pH 5,8 und das Spektrum von ^{15}N -Cyclin T1 384-511 bei pH 6,2 dargestellt. Beide Spektren zeigen keine Anzeichen für das Vorhandensein einer Tertiärstruktur. Stattdessen zeigen die Spektren nur eine geringe Dispersion der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Resonanzsignale mit einigen Signalüberlappungen. Die überwiegende Anzahl dieser Signale ist im Bereich 8,0 bis 8,5 der Protonenresonanzfrequenz lokalisiert, wie es typischerweise für *random-coil* Sequenzen beobachtet wird.

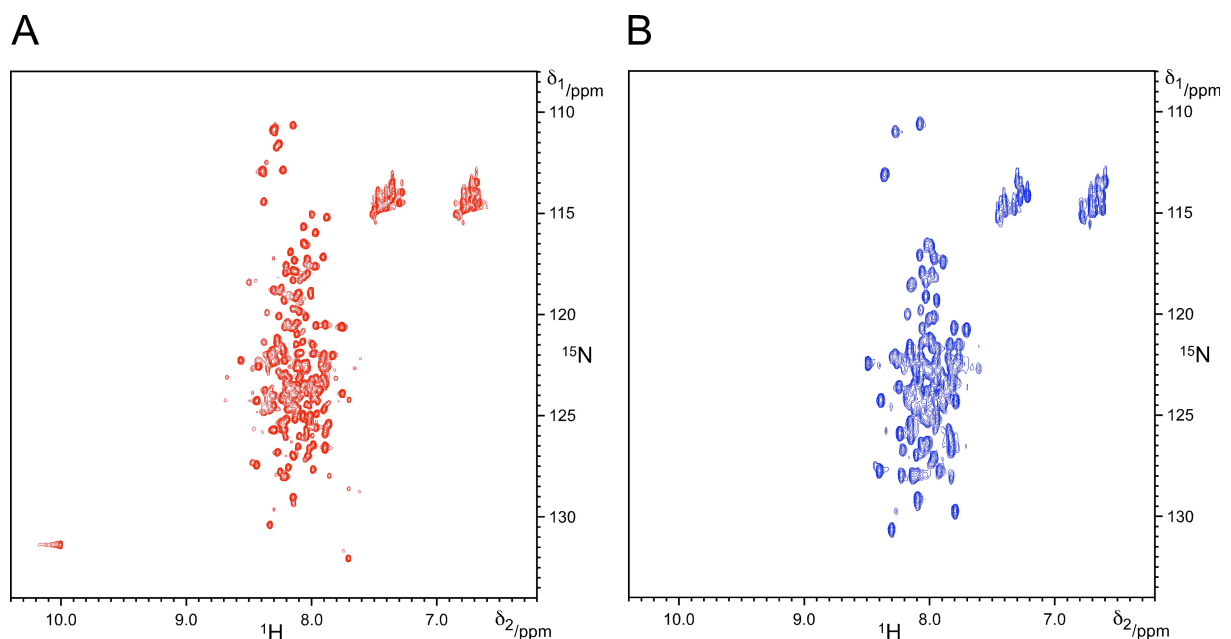


Abbildung 45: HSQC Spektren von ^{15}N -Cyclin T1 321-566 (A) und ^{15}N -Cyclin T1 384-511 (B). Spektrum A wurde bei einem pH-Wert von 5,8 und einer Temperatur von 25°C aufgenommen, Spektrum B bei pH 6,2 und 15°C.

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen bestätigen die schon in den CD-spektroskopischen Messungen gemachte Beobachtung, dass die in dieser Arbeit generierten Proteine, die die zentralen Reste von Cyclin T1 umfassen, größtenteils unstrukturiert vorliegen. Es ist denkbar, dass die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen in diesem Bereich nur im Kontext des Volllängenproteins oder bei Interaktion mit Bindungspartnern möglich ist.

4.4.3 Interaktionsstudien zwischen RNA-Pol II CTD und Cyclin T1 sowie P-TEFb

Die in der Literatur beschriebene Bindung der RNA-Pol II CTD an die zentrale Region von Cyclin T1 wurde mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie untersucht. Zu diesem Zweck wurde die neun Heptade lange GST-KCTD in einem iTC_{200} Mikrokalorimeter gegen Cyclin T1 321-566 titriert. Die eingesetzten Konzentrationen betragen $200 \mu\text{M}$ für das GST-KCTD Fusionsprotein und $20 \mu\text{M}$ für Cyclin T1. In der ITC Messung wurde für alle Injektionen eine geringe, gleichstarke Wärmetönung beobachtet (Abbildung 46 A). Eine Bindung zwischen den beiden Proteinen konnte somit unter den verwendeten Bedingungen nicht gezeigt werden. In zwei weiteren ITC-Experimenten wurde anschließend analysiert, ob die GST-KCTD, die als Substrat von Cdk9 fungiert, mit P-TEFb oder Cyclin T1 1-272 interagiert. Die erhaltenen ITC-Messungen sind in Teil B und C der Abbildung dargestellt.

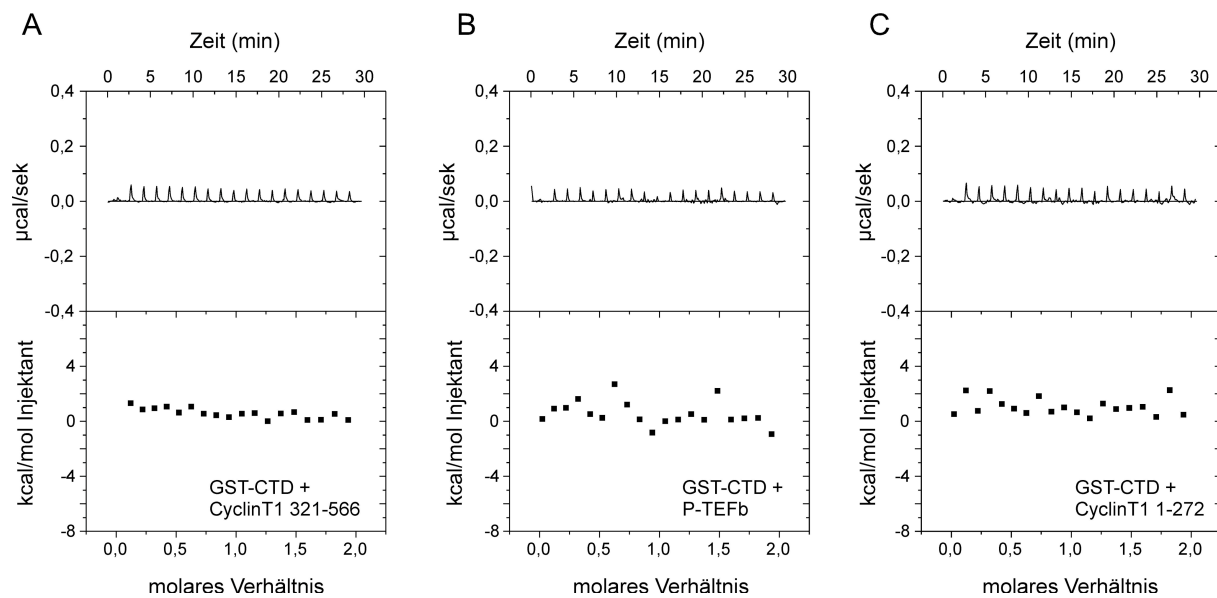


Abbildung 46: ITC-Messungen zwischen einem neun Heptad-langen GST-KCTD Fusionsprotein mit Cyclin T1 321-566 (A), P-TEFb (B) und Cyclin T1 1-272 (C). Die Messungen wurden in einem iTC_{200} Mikrokalorimeter bei einer Temperatur von 15°C durchgeführt. Für die Messungen A und C wurde ein Puffer mit 50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, $0,5 \text{ mM}$ TCEP verwendet. Messung B erfolgte in 50 mM Hepes pH 7,5, 250 mM NaCl, 5% Glycerol, 5 mM β -ME, 4 mM MgCl_2 , 2 mM AppNHp.

Für die Messung mit dem Cdk9-Cyclin T1 Heterokomplex wurden Konzentrationen von $90 \mu\text{M}$ für GST-KCTD und $9 \mu\text{M}$ für P-TEFb eingestellt. Die Proteine waren zuvor in einem Puffer dialysiert worden, der 4 mM MgCl_2 und 2 mM des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons AppNHp enthielt. Ähnliche Bedingungen waren zuvor erfolgreich zur Kristallisation von P-TEFb im Nukleotid-gebundenen Zustand eingesetzt worden (Baumli et al., 2008). Für die Messung der Cyclin-Boxen mit der GST-KCTD wurden $167 \mu\text{M}$ Cyclin T1 1-272 gegen $17 \mu\text{M}$ GST-KCTD titriert. Auch hier konnte unter den genannten Bedingungen keine Bindung zwischen GST-KCTD und Cyclin T1 1-272 bzw. P-TEFb beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Interaktionsstudien zwischen den Hexim-Homologen und Cyclin T1/T2, der 7SK RNA sowie Importin α

In dieser Studie wurden die Interaktionen der beiden Hexim-Homologe Hexim1 und Hexim2 mit Cyclin T1 und T2 sowie der 7SK RNA mit biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht. Für Hexim2 konnte zunächst ein minimales C-terminales Konstrukt mit den Grenzen 184-286 identifiziert werden, das mit ähnlicher Affinität wie Hexim2 fl an die Cyclin-Boxen von Cyclin T1 bindet. Aufgrund der hohen Sequenzidentität der beiden Hexim-Homologe in ihren C-terminalen 120 Aminosäuren ist die Ausbildung einer parallelen *coiled-coil* Struktur auch für Hexim2 wahrscheinlich. Nach Sequenzvergleich mit Hexim2 umfasst diese Struktur die Positionen 210 bis 276 in Hexim2. Jedoch scheint nicht nur die Integrität dieser *coiled-coil* Struktur sondern auch die des vorausgehenden Aminosäurebereichs von Position 184 bis 209 für die Bindung an Cyclin T1 notwendig zu sein, wie GST-*pull-down*-Experimente mit N-terminal verkürzten Hexim2 Proteinen zeigten. Dabei kann angenommen werden, dass diese zwischen den beiden Hexim-Homologen hochkonservierte Region in Hexim2 ebenfalls eine kurze Helix (α 1) ausbildet, die mit dem ersten Strang des gegenüberliegenden *coiled-coils* wechselwirkt und die negativ geladene Cyclin T-Bindungsfläche formt. Ein Modell der Hexim2-TBD Struktur, das mit dem Programm Phyre erstellt wurde, ist in Abbildung 47 dargestellt.

In detaillierten ITC-Bindungsstudien wurden interessanterweise die stärksten Affinitäten für die wechselseitige Hexim1-Cyclin T1 und Hexim2-Cyclin T2 Interaktion beobachtet. Hier ergaben sich in beiden Fällen Dissoziationskonstanten von 2,5 μ M. Die Affinitäten von Hexim1 zu Cyclin T2 und Hexim2 zu Cyclin T1 waren hingegen jeweils um einen Faktor vier schwächer. Bisher ist nicht geklärt, wie dieser Unterschied, der im Rahmen der Messgenauigkeit allerdings als moderat anzusehen ist, zustande kommt. Dames et al. haben gezeigt, dass die Hexim1-Cyclin T1 Bindung elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem negativen Ladungsbereich von Hexim1 und einer Region positiver Ladung von Cyclin T1 beinhaltet (Dames et al., 2007). Möglicherweise sind geringe Sequenzunterschiede und damit verbundene Ladungsänderung auf der Oberfläche der Cyclin und Hexim Moleküle für die beobachteten Unterschiede verantwortlich. Im Kontext der Vollängen

Proteine ist zudem denkbar, dass Aminosäuren C-terminal der Cyclin-Boxen einen Einfluss auf die Assoziation von Hexim und Cyclin T ausüben können.

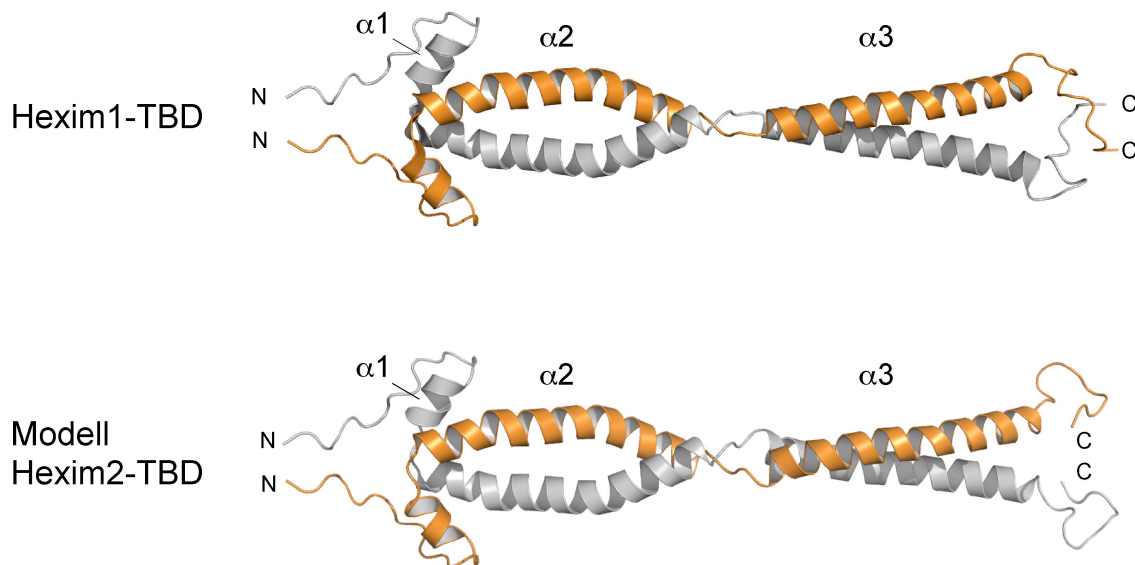


Abbildung 47: Topologie der Cyclin T-Bindungsdomäne von Hexim. Dargestellt ist die NMR-Struktur der Hexim1-TBD von Position 261 bis 359 sowie ein Modell der Hexim2-TBD, das mit Hilfe des Programms Phyre erstellt wurde (<http://sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>). Die Struktur umfasst den Aminosäurebereich in Hexim2 von Position 187 bis 286.

In mehreren Zelllinien wurde gezeigt, dass Hexim1 ein weit höheres Expressionsniveau als Hexim2 aufweist und den bevorzugten Bindungspartner von P-TEFb darstellt (Byers et al., 2005). Zudem sollen ungefähr 80% des in der Zelle vorhandenen Cdk9 mit Cyclin T1 assoziiert sein, so dass der inhibierte Komplex aus Cdk9-Cyclin T1 und Hexim1 zu überwiegen scheint (Kohoutek et al., 2009; Peng et al., 1998b). In einer weiteren Studie wurde berichtet, dass sich die Menge der mRNA-Expressionsmuster der beiden Hexim-Homologe in verschiedenen Geweben unterscheiden. So wurden hohe mRNA-Gehalte von Hexim2 vor allem in Hoden, Eierstock, Leber und Hirn gefunden, Hexim1-mRNA ist dagegen in der Plazenta stark vertreten (Yik et al., 2005). Auch die Cyclin T1 und Cyclin T2 mRNA-Gehalte variieren in verschiedenen Geweben stark, eine Korrelation zwischen den mRNA-Gehalten der beiden Hexim- und Cyclin T-Isoformen konnte jedoch nicht festgestellt werden (Byers et al., 2005; Kohoutek et al., 2009). Weiterhin unklar ist deshalb, welche Mechanismen der Formierung möglicher Hexim-Cyclin T Komplexe in den Geweben zu Grunde liegen. Die hier gemachte Beobachtung, dass beide Hexim-Homologe ähnliche Affinitäten sowohl an Cyclin T1/T2 als auch an die 7SK RNA aufweisen, ist jedoch in Einklang mit bisherigen Ergebnissen, dass Hexim1 und Hexim2 einen Komplex mit der 7SK RNA und P-TEFb unabhängig von der enthaltenden Cyclin T-Isoform ausbilden kann (Byers et al., 2005). Während Hexim1 und Hexim2 eine hohe Homologie in ihren C-terminalen Aminosäuren aufweisen, sind die Bereiche N-terminal des basischen Bereichs verschieden. Diese Region könnte Interaktionen mit verschiedenen Proteinen eingehen und so eine differentielle Regulation und möglicherweise auch Lokalisation der beiden Protein ermöglichen.

Es wurde beschrieben, dass Hexim2 nach einem *knock-down* von Hexim1 diesen Verlust durch die Assoziation mit P-TEFb ausgleichen und so das Gleichgewicht zwischen inaktiven und aktiven P-TEFb aufrechterhalten kann (Byers et al., 2005; Yik et al., 2005). Eine neueste Studie über die Bedeutung von Cyclin T2 während der Entwicklung von Mäusen ergab ferner, dass die beiden Cyclin-Isoformen neben überwiegend redundanten Funktionen auch einige nichtredundante Funktionen während der Embryogenese und frühen Entwicklung von Säugern aufweisen. So scheinen einige Gene von den beiden Cyclin T-Isoformen unterschiedlich reguliert zu werden (Kohoutek et al., 2009). Bisher war das virale Protein Tat das einzige Beispiel dafür, dass die beiden Cycline nicht vollständig redundante Funktionen besitzen (Wimmer et al., 1999). Tat stimuliert die Expression des viralen Genoms durch Rekrutierung des Heterokomplexes aus Cdk9 und Cyclin T1 an das HIV-LTR, Cyclin T2 ist hingegen nicht zur Tat-Transaktivierung befähigt.

Interaktion von Hexim mit der 7SK RNA

Die in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Untersuchungen zur Hexim-7SK RNA Interaktion identifizierten ein 7SK RNA Konstrukt bestehend aus nt 22-87 als Hexim1- und Hexim2-Binderegion. EMSA-Analysen zeigten, dass Hexim1 eine ähnliche Affinität an diese 66-mer RNA aufweist, wie an die Vollängen 7SK RNA. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit bisherigen Untersuchungen von Egloff *et al.*, widersprechen jedoch der Studie von Li *et al.*, nach welcher eine kürzere 39-mer 7SK RNA (nt 10-48) die Hexim-Binderegion darstellt (Egloff et al., 2006; Li et al., 2007). Für diese 39-mer RNA konnte bei den verwendeten Konzentrationen keine vollständige Bindung der RNA beobachtet werden, die Affinität von Hexim1 zu diesem RNA-Konstrukt schien mindestens um einen Faktor 8-10 geringer. Beide RNA-Konstrukte erwiesen sich jedoch als stabil und zeigten ein homogenes Laufverhalten auf einer analytischen Gelfiltrationssäule. Interessanterweise ist die Sequenz der 5'-terminalen Region, die die 66-mer Haarnadelschleife enthält, in Vertebraten hochkonserviert (Gruber et al., 2008). In der genannten Studie wurden ebenfalls Faltungsvorhersagen der RNA durchgeführt, die die Ausbildung der längeren RNA-Haarnadelstruktur nicht aber der 39-mer Haarnadelstruktur für die 7SK RNA untermauern. Zudem wurde erst in einer kürzlich erschienenen Studie gezeigt, dass Hexim1 eine RNA-Haarnadelschleife bestehend aus den nt 24-87 bindet, wobei die Bindungsregion auf die 5'-terminale Seite der RNA-Struktur eingegrenzt wurde. (Belanger et al., 2009). Jedoch wurden in dieser Studie keine Affinitäten zwischen der RNA und Hexim1 bestimmt.

In dieser Arbeit wurden Dissoziationskonstanten um $0,3 \mu\text{M}$ für Hexim1-Cyclin T1 an 7SK RNA fl und 7SK RNA (22-87) ermittelt. Ein Problem, das sich bei der Bestimmung dieser Werte ergab, war die Verunreinigung der Hexim-Proteine mit unspezifischen RNA bzw. DNA Fragmenten aus *E.coli*. Die Bindung doppelsträngiger RNA unabhängig von ihrer Sequenz an Hexim wurde schon zuvor in früheren Studien beobachtet und erschwerte einen Vergleich der Affinitäten der Hexim-Proteine an die 7SK RNA (Li et al., 2007). Es ist deshalb davon auszugehen, dass die erhaltenen K_d Werte einen oberen Grenzwert repräsentieren. Erstaunlicherweise lieferten erste Untersuchungen, die mit dem Benzonase-behandelten Hexim durchgeführt wurden, einen ähnlichen apparenten K_d Wert von ca. $0,5 \mu\text{M}$. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass nach dem Benzonase-Verdau entstandene Oligonukleotide an Hexim gebunden blieben und die Interaktion mit der 7SK RNA

beeinflussen. In dem mit dem Benzoylase behandelten Protein konnte zudem erstmals ein eindeutiger *Supershift* der RNA beobachtet werden, der zuvor ebenfalls in anderen Studien für die Vollängen 7SK RNA und die 5'-Haarnadelschleife beschrieben wurde (Belanger et al., 2009; Byers et al., 2005; Michels et al., 2004). Diese Ergebnisse deuten auf eine zweite Bindungsstelle von Hexim an die 7SK RNA hin.

In einer weiteren Serie von Gelverschiebungsanalysen wurde die Bindung von Hexim1, Hexim2 und einem verkürztem Hexim1 110-359 an das 66-mer 7SK RNA Konstrukt untersucht. Die apparenten Dissoziationskonstanten waren im Rahmen der Messgenauigkeit für alle Proteine nahezu identisch und glichen denen, die für den Komplex aus Hexim und Cyclin ermittelt wurden. Eine Beteiligung der 3'-Haarnadelschleife der 7SK RNA an der Bindung von Hexim1-Cyclin T1 konnte somit nicht beobachtet werden, ebenso wenig wie ein Einfluss der N-terminalen Aminosäuren von Hexim1 auf die Bindung der 7SK RNA. Egloff et al. identifizierten die 3'-Haarnadelschleife als Bindungsmotiv für P-TEFb, wobei diese Bindung an die RNA wahrscheinlich über Hexim1 vermittelt wird (Egloff et al., 2006). Ein solcher Mechanismus hätte Ähnlichkeit mit der Transkriptionsaktivierung des HIV-Genoms, bei der das virale Protein Tat P-TEFb an die HIV-1 TAR-RNA rekrutiert und kooperative Wechselwirkung an der Ausbildung des RNA-Protein Komplexes beteiligt sind.

Interaktion von Hexim mit Importin α

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels *GST-pull-down*-Experimenten und ITC-Messungen gezeigt werden, dass beide Hexim-Homologe mit dem nukleären Importfaktor Importin α im niedrigen mikromolaren Bereich interagieren. Dabei wurde eine geringfügig höhere Affinität von Hexim2 zu Importin α im Vergleich zu Hexim1 beobachtet. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das zweite in Hexim1 vorhandene basische Motiv nicht zu einem zweigeteilten NLS beiträgt, da in diesem Fall mit einem deutlichen Unterschied in den ermittelten Dissoziationskonstanten und einer höheren Affinität von Hexim1 an Importin α zu rechnen wäre. Für die Bindung von NLS-Peptiden an Importin α , dem die autoinhibitorische Importin β Binde-domäne fehlt, wurden K_d Werte um 10 nM berichtet (Stewart, 2007). Aus diesem Grund überraschen die hier gemessenen Dissoziationskonstanten, die im niedrigen mikromolaren Bereich liegen. Mögliche Ursachen für die schwächere Affinität könnten die Verunreinigungen der Hexim-Proteine mit RNA sein. Ferner könnte ein höherer K_d durch die Verwendung von Vollängen Proteinen anstelle von NLS-Peptiden zustande kommen. Die *GST-pull-down*-Experimente legen die zeitgleiche Bindung von Hexim1 an Importin α und Cyclin T1 nahe, die Existenz eines solchen ternären Komplexes konnte aber nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Hexim-Homologen besitzen die Cycline T1/T2 keine klassischen nukleären Importsignale und eine Kolo-kalisation von Hexim und Cyclin T in den Zellkern könnte sicherstellen, dass keine freien Cyclin-Moleküle im Nukleus akkumulieren, die zur einer Aktivierung von Cdk9 beitragen. Allerdings wurde erst kürzlich eine neue Art von Kernimportsignal beschrieben, für das gezeigt wurde, dass es direkt mit Importin β interagiert. Dieses Signal könnte für den C-terminalen Bereich von Cyclin T1 gelten. Auch ein Hexim-Peptid bestehend aus Aminosäuren 131-167 bindet direkt an Importin β (Lee et al., 2006). Die Bindung sowohl von Importin α als auch von Importin β könnte die nukleäre Lokalisation von Hexim in verschiedenen Geweben und Organen sicherstellen, wie es von Barboric et al. vorgeschlagen wurde (Barboric et al., 2005). Zudem

wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von Cyclin T1 die nukleäre Lokalisation von Cdk9 vermittelt und dass dieser Effekt von der Anwesenheit vorgeschlagener Autophosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich von Cdk9 abhängt (Napolitano et al., 2002; Napolitano et al., 2003). Es ist somit noch unklar, welche Komponenten des P-TEFb Komplexes gemeinsam in den Zellkern gelangen und welche Regulationsmechanismen diesem Transport zugrunde liegen. Interessant ist zudem die Fragestellung, mit wie vielen Importin-Molekülen ein Hexim-Dimer interagiert. Die hier erhaltenen Daten weisen nicht auf das Vorliegen einer 1:1 Stöchiometrie von Importin α und Hexim hin. In zukünftigen Analysen sollte das Benzozonase-behandelte Hexim verwendet werden, das erstmals auch eine Analyse der Hexim-Importin Bindung mittels Größenausschlusschromatographie erlauben sollte.

5.2 Mechanistische Studien zur Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 durch Hexim1

Einen zentralen Bestandteil dieser Arbeit stellten die Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften von Hexim1 auf die Cdk9 Kinaseaktivität dar. Diese Studien setzten zunächst die Reinigung von P-TEFb voraus. Initiale Versuche den Heterokomplex durch Coexpression von Cdk9 und Cyclin T1 aus *E.coli* zu erhalten, waren nicht erfolgreich. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die richtige Faltung der Kinaseuntereinheit in *E.coli* nicht gewährleistet ist. Der Proteinkomplex aus *E.coli* zeigte ferner keine Kinaseaktivität gegenüber einem neun Heptad langem CTD-Substrat. Als Alternative wurde deshalb das Baculovirus-Expressionssystem verwendet und zwei verschiedene Expressionsstrategien etabliert. Diese lieferten den Cdk9-Cyclin T1 Komplex in hoher Reinheit und mit erwarteter äquimolarer Stöchiometrie. Für Cdk9 fl wurde nach Entfernen des N-terminalen Hexahistidinkinners ein Molekulargewicht ermittelt, das auf eine vollständige Phosphorylierung des Proteins hinwies. Dagegen entsprach das ermittelte Molekulargewicht von Cdk9 aus der Dualexpression dem eines phosphorylierten Zustands nur unter der Annahme, dass das initiale Methionin entfernt worden ist und zwei Na-Ionen gebunden sind. Baumli et al. berichteten, dass Cdk9 zur Autophosphorylierung an Thr186 in *cis* befähigt ist (Baumli et al., 2008). Ihr Protein, welches nach Coexpression mit Cyclin T1 unter Verwendung zweier Viren in Insektenzellen gereinigt wurde, wies einen Phosphorylierungsgrad von ca. 80% auf. Durch Inkubation mit ATP konnte eine vollständige Phosphorylierung des Thr186 erzielt werden. Eine Inkubation der in dieser Arbeit aus der Coexpression erhaltenen Probe mit ATP führte zu keiner Veränderung des Molekulargewichts von Cdk9 (Daten nicht gezeigt). Da die Heterokomplexe der beiden Proteinpräparationen ähnliche Aktivität im radioaktiven Kinaseassay aufwiesen, ist davon auszugehen, dass Cdk9 aus der Dualexpression ebenfalls phosphoryliert vorliegt. Erstmals konnte somit funktionales P-TEFb durch die Zugabe von rekombinant gereinigtem Cyclin T1 1-272 formiert werden. In bisherigen Studien erfolgte immer eine Coexpression beider Proteine. Die getrennte Expressionsstrategie bietet die Möglichkeit schnell diverse Cdk-Cyclin Komplexe mit unterschiedlichen Cyclin-Untereinheiten zu formieren, ohne diese für die Verwendung im Baculovirus-Expressionssystem klonieren zu müssen. Diese höhere Variabilität kommt insbesondere künftigen Kristallisations- und Interaktionsstudien zugute.

Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 und 7SK RNA

Hexim1 ist der bislang einzige bekannte Kinaseinhibitor, dessen Aktivität die Anwesenheit einer kleinen nukleären RNA erfordert (Michels et al., 2004; Yik et al., 2003). Obwohl mehrere Studien die Bedeutung bestimmter Aminosäuren für die Hexim-Aktivität dokumentieren, ist der genaue Mechanismus, wie dieser Protein-RNA Komplex die Aktivität von P-TEFb inhibiert, immer noch ungeklärt. Unter anderem wurde vorgeschlagen, dass F208 oder Y271 die ATP-Bindungsstelle blockieren, ferner wurde dem konservierten PYNT-Motiv eine Bedeutung für die Bindung an P-TEFb und Inhibition der Kinaseuntereinheit zugeschrieben (Li et al., 2005; Michels et al., 2004). Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit Sonja Dames identifizierten die C-terminalen Aminosäuren von 255-359 als Cyclin T-Bindungsdomäne, die ein paralleles dimeres *coiled-coil* ausbildet (Dames et al., 2007; Schulte et al., 2005). Da Hexim1 jedoch von dem Cdk9-Cyclin T1 Komplex präzipitiert wird, scheint ein Mechanismus ähnlich dem der INK-Inhibitoren, welche die Assoziation der Kinase mit dem Cyclin inhibieren, recht unwahrscheinlich (siehe 2.4.2). Vielmehr wurde vermutet, dass Hexim ähnlich der Kip-Inhibitoren ein Tyrosin in die ATP-Bindungsstelle inseriert und hierdurch eine Inhibition der Kinase bewirken könnte. In dieser Arbeit wurden verschiedene Hexim Konstrukte mittels des radioaktiven Kinaseassays auf ihre Fähigkeit hin untersucht, P-TEFb zu inhibieren. Essentiell für die inhibitorische Wirkung des Hexim1 Proteins war eine Region von Position 200 bis 207 in Hexim1. Diese Region beinhaltet das hochkonservierte PYNT-Motif, dessen Mutation zu Glycinen die Inhibition von P-TEFb durch Hexim1 nahezu vollständig aufhob. Eine Mutation des Tyrosins, von dem vermutet wurde, dass es die Purinbase des ATP nachahmen könnte, hatte jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Inhibition der Kinaseaktivität. Dagegen führte die Mutation des T205 zu Glycin zu einem fast vollständigen Verlust der inhibitorischen Fähigkeiten. Die hier gemachten Ergebnisse stehen zum Teil in Einklang mit bisherigen Ergebnissen, die ebenfalls einen Einfluss des PYNT-Motivs auf die Kinaseaktivität zeigten (Byers et al., 2005; Michels et al., 2004). In der Studie von Michels wurde jedoch berichtet, dass Tyrosin 203 und Threonin 205 an der Bindung zu P-TEFb beteiligt sind, da in *GST-pull-down*-Experimenten keine Bindung der Hexim-Mutanten an P-TEFb beobachtet werden konnte. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse können diese Ergebnisse nicht bestätigen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die in dieser Studie generierten Mutanten nicht im Kontext des Volllängen Proteins durchgeführt und Mutationen der entsprechenden Aminosäuren zu Glycin und nicht zu der negativ geladenen Aminosäure Aspartat vorgenommen wurden, wie in der beschriebenen Arbeit.

Im Rahmen meiner Arbeit wurde mittels ITC-Messungen erstmals die Affinität von P-TEFb zu Hexim1 194-359 bestimmt. Für die Dissoziationskonstante wurde ein Wert von 0,3 μM erhalten. Hingegen lieferten die Messungen mit P-TEFb und Hexim1 194-359 T205G einen K_d von 2,3 μM . Dieser Wert ähnelte dem, der für die Bindung des Hexim1 wt Proteins an Cyclin T1 erhalten wurde. Weitere ITC-Messungen zeigten, dass zwei Hexim Proteine mit Mutationen im PYNT-Motiv eine ähnliche Affinität zu Cyclin T1 aufwiesen wie das wt-Protein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Bindung von Hexim an P-TEFb trotz Mutation im konservierten PYNT-Motiv an Cyclin T1 immer noch möglich ist, und dass die Interaktion des PYNT-Motivs auf Seiten der Kinase stattfindet. Die Beobachtung der *Stopped-Flow* Messungen, dass an Position 198 fluoreszenzmarkiertes Hexim1 eine bedeutend stärkere

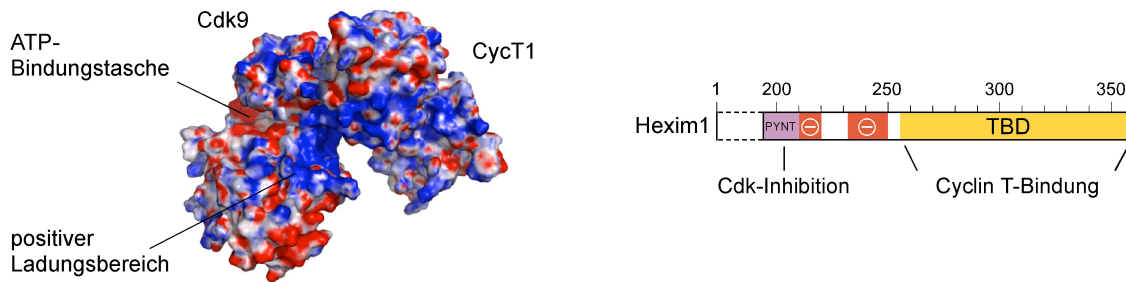
Signaländerung bei Mischen mit P-TEFb als mit Cyclin T1 alleine zeigt, lässt ebenfalls eine Bindung dieser Region auf der Kinaseuntereinheit vermuten, bedarf jedoch zur Bestätigung noch weiterer Untersuchungen. Bei der Auswertung der ITC-Messungen wurde ein Stöchiometriefaktor von 1 für die Interaktion von Hexim1 194-359 mit Cyclin T1 beobachtet. Dieser Wert überraschte, da in den Messungen mit der Hexim1-TBD ein Stöchiometriefaktor von 0,5 erhalten wurde, der darauf hindeutet, dass ein Hexim-Dimer ein Cyclin T1 Molekül bindet. Diese Unterschiede könnten dadurch erklärt werden, dass im Falle der Hexim-TBD eine kleinere Bindungsfläche für Cyclin T1 zur Verfügung steht. Bei dem längerem Hexim Molekül könnten zusätzliche Kontakte zur Cyclin-Box ausgebildet werden, die auch die Assoziation eines zweiten Cyclin-Moleküls erlauben könnten. Unklar ist dann jedoch, warum die Messungen mit den Vollängen Hexim Proteinen ebenfalls einen Wert von 0,5 ergaben.

Interessanterweise konnte für das C-terminal deletierte Hexim1 1-254 in Anwesenheit der 66-mer RNA eine Inhibition der Kinaseaktivität bis auf 30% beobachtet werden, während die RNA ebenso wie das Proteinfofragment alleine keinen Einfluss auf die Aktivität hatte. Hexim1 1-254 bindet jedoch nicht an Cyclin T1 1-272 (Schulte et al., 2005). Ein ähnlicher Effekt wurde von Li et al. für Hexim1 1-282 unter Verwendung der 331 nt langen 7SK RNA beschrieben (Li et al., 2005). Übereinstimmend mit bisherigen Untersuchungen wurde ferner gezeigt, dass Vollängen Hexim1 nur in Anwesenheit der 7SK RNA einen potenten Kinaseinhibitor darstellt. In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass die 5'-Haarnadelschleife zu diesem Zweck ausreichend ist. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Hexim1 1-254 erst zusammen mit der 7SK snRNA eine Konformation einnimmt, die es dem Protein ermöglicht als Kinaseinhibitor zu wirken.

Aus den bisher bekannten Daten ergeben sich mehrere Möglichkeiten, wie Hexim die Kinaseaktivität von Cdk9 inhibieren könnte. Zum einem ist denkbar, dass Hexim1 nach Bindung der TBD an Cyclin T1 einen Pfad auf der Oberfläche von P-TEFb einnimmt, der dem des Inhibitors p27^{Kip} auf Cdk2-CyclinA ähnelt (Abbildung 48 B, links). Zwischen dem Erkennungsmotiv auf dem Cyclin und dem inhibierenden Tyrosin liegen im Falle des Kip-Inhibitors ca. 70 Aminosäuren. Eine ähnliche Distanz besteht zwischen dem konservierten PYNT-Motiv und der Cyclin T1-Bindungsregion auf Hexim1. Hexim1 könnte dann die Kinase ebenso durch Insertion des PYNT-Motivs in die ATP-Bindungsstelle hemmen. Denkbar wäre auch, dass Hexim eine Umstrukturierung des N-terminalen Flügels der Kinase bewirkt, die eine Bindung des ATP ausschließt. Der starke Effekt der Mutation von Threonin 205 lässt vermuten, dass dieser Rest entweder Interaktionen mit Cdk9 eingeht oder eine strukturelle Änderung in dieser Region von Hexim bewirkt, die eine Bindung an die Kinase deutlich erschwert. Alternativ könnte Hexim einen Weg ähnlich des Cdk2-Substrats Cdc6 einnehmen und ebenfalls über die gerade besprochenen Mechanismen eine Inhibition herbeiführen (Abbildung 48 B, rechts). Auch eine Blockierung der Substratbindungsstelle ist vorstellbar. Cdk9 besitzt einen großen positiv geladenen Oberflächenbereich, der als Bindungsstelle für die konservierten negativ geladenen Bereiche in Hexim oder auch für eine an Serin2 und Serin5 phosphorylierte CTD dienen könnte. Ein solcher Pfad auf der Oberfläche des Cdk-Cyclin Komplexes würde allerdings weit weniger Aminosäuren zwischen der Cyclin T1 Bindungsstelle und der Kinase erfordern. Es ist denkbar, dass die dazwischen liegenden Aminosäuren durch Assoziation mit der 7SK RNA stabilisiert werden. Vor kurzem wurde

zudem berichtet, dass neben der 7SK RNA Bindungsstelle im zentralen Bereich auch Positionen 210 bis 220 in Hexim1 mit der 66-mer Haarnadelschleife der RNA interagieren (Belanger et al., 2009). Da bisher davon ausgegangen wurde, dass die Bindung der RNA über positiv geladene Aminosäuren vermittelt wird und dieser Bereich das erste negative Ladungscluster in Hexim umfasst, ist dieses Ergebnis ein wenig ungewöhnlich.

A



B

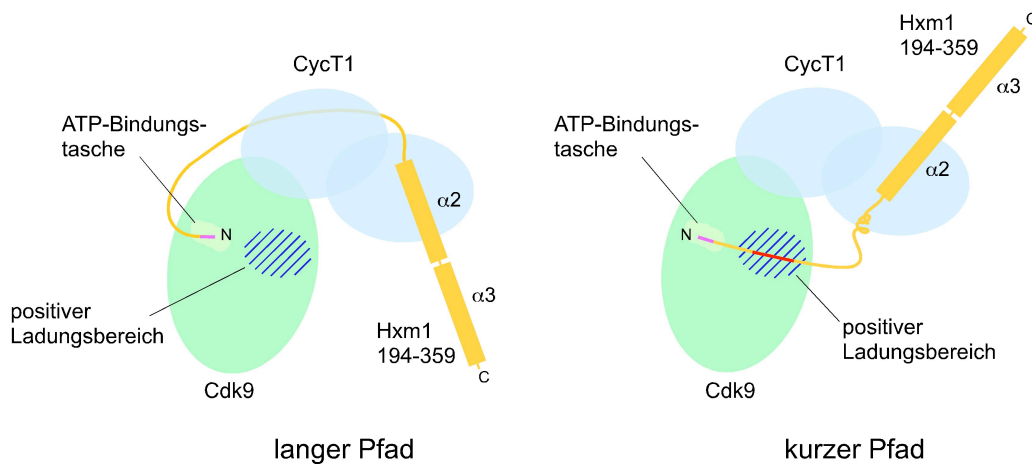


Abbildung 48: Inhibition von P-TEFb durch Hexim1. A: Elektrostatistisches Oberflächenpotential von P-TEFb (dargestellt von $-10 k_B T$ bis $+10 k_B T$ mit Hilfe des Programms APBS). Positiv geladene Bereiche sind blau und negativ geladene Bereiche rot dargestellt. Rechts: Domänenarchitektur von Hexim1 194-359. Das für die Inhibition essentielle PYNT-Motiv sowie die TBD sind gekennzeichnet. B: Mögliche Pfade von Hexim1 194-359 auf der Oberfläche von P-TEFb. Die kurze, vorausgehende Helix $\alpha 1$ von Hexim1 wurde zur Vereinfachung des Modells nicht dargestellt.

Neben einer weiteren biochemischen Charakterisierung der Hexim-Bindung an P-TEFb scheint eine strukturelle Analyse zur Klärung des Inhibitionsmechanismus von Hexim notwendig zu sein. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien sind ein wichtiger Beitrag für die Wahl von Hexim Konstrukten für künftige strukturelle Untersuchungen des inhibierten P-TEFb Komplexes.

5.3 Phosphorylierung der CTD durch P-TEFb

Ein Ergebnis dieser Arbeit zeigte, dass die dargestellten CTD Proteine mehrfach von P-TEFb phosphoryliert wurden. Die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände konnten sowohl massenspektrometrisch als auch im SDS-Gel dargestellt werden. Der Nachweis welche Aminosäure bzw. Aminosäuren phosphoryliert wurden, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht erfolgen. Bei den durchgeführten Zeitverläufen fiel jedoch auf, dass mit den GST-Substraten zunächst ein Phosphorylierungsgrad erreicht werden konnte, der der Zahl der vorhandenen Heptadwiederholungen entsprach. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass jedes Heptad genau einmal von Cdk9 phosphoryliert wurde. Jedes Heptad besitzt jedoch zwei Serine (Ser2 und Ser5), die dem Konsensusmotiv von Cdks folgen und somit phosphoryliert werden könnten (Kapitel 2.3). Bisher weisen die meisten Studien darauf hin, dass P-TEFb die CTD an Serin2 der Heptadwiederholung phosphoryliert (Meinhart et al., 2005). Obwohl die gereinigten CTD Konstrukte eindeutig als Substrat von P-TEFb dienten, konnte eine Interaktion zwischen einer neun Heptad-langen GST-KCTD und P-TEFb mittels ITC-Messung bei den verwendeten Konzentrationen (9 μM P-TEFb) nicht beobachtet werden. Ebenso wenig konnte durch Fluoreszenz-Anisotropie Messungen unter Verwendung von 3 μM mant-ATP und 4 μM P-TEFb eine Bindung von ATP an Cdk9 gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Durch HPLC-Läufe wurde jedoch zuvor bestätigt, dass die Kinase kein Nukleotid gebunden hatte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Affinitäten von ATP und der CTD im höheren mikromolaren Bereich liegen. Im Vergleich hierzu weist phosphoryliertes Cdk2 im Komplex mit Cyclin A eine Affinität zu ATP im nanomolaren Bereich auf (Heitz et al., 1997).

Für die Phosphorylierung der CTD-Wiederholungseinheiten sind zwei Mechanismen vorstellbar. Zum einen könnte Cdk9 die CTD nach einem sogenannten distributiven Mechanismus phosphorylieren. Dies würde bedeuten, dass das Enzym willkürlich an die CTD bindet und nach erfolgter Serin-Phosphorylierung wieder entlässt. Eine erneute Assoziation der beiden Moleküle wäre in diesem Fall für die folgende Phosphorylierung nötig. Alternativ ist jedoch auch ein prozessiver Mechanismus vorstellbar, bei dem das Enzym während der Phosphorylierungsschritte am Substrat gebunden bleibt und dieses erst entlässt, wenn alle weiteren Positionen in einer beliebigen Arbeitsrichtung phosphoryliert worden sind. Die beiden Mechanismen sind schematisch in zwei Modellen in Abbildung 49 dargestellt. Bei gleicher Enzymaktivität unterscheidet sich sowohl die Zahl der phosphorylierten Substrate als auch die Anzahl der erhaltenen Phosphorylierungen pro Substrat bei den beiden Mechanismen. Eine Verteilung, wie sie bei den aufgenommenen ESI-Spektren erhalten wurde, steht nur im Einklang mit dem distributiven Modell. Diese Analyse ist jedoch nur unter der Annahme gültig, dass die phosphorylierten Zustände gleiche Eigenschaften bezüglich ihrer Detektion im ESI besitzen.

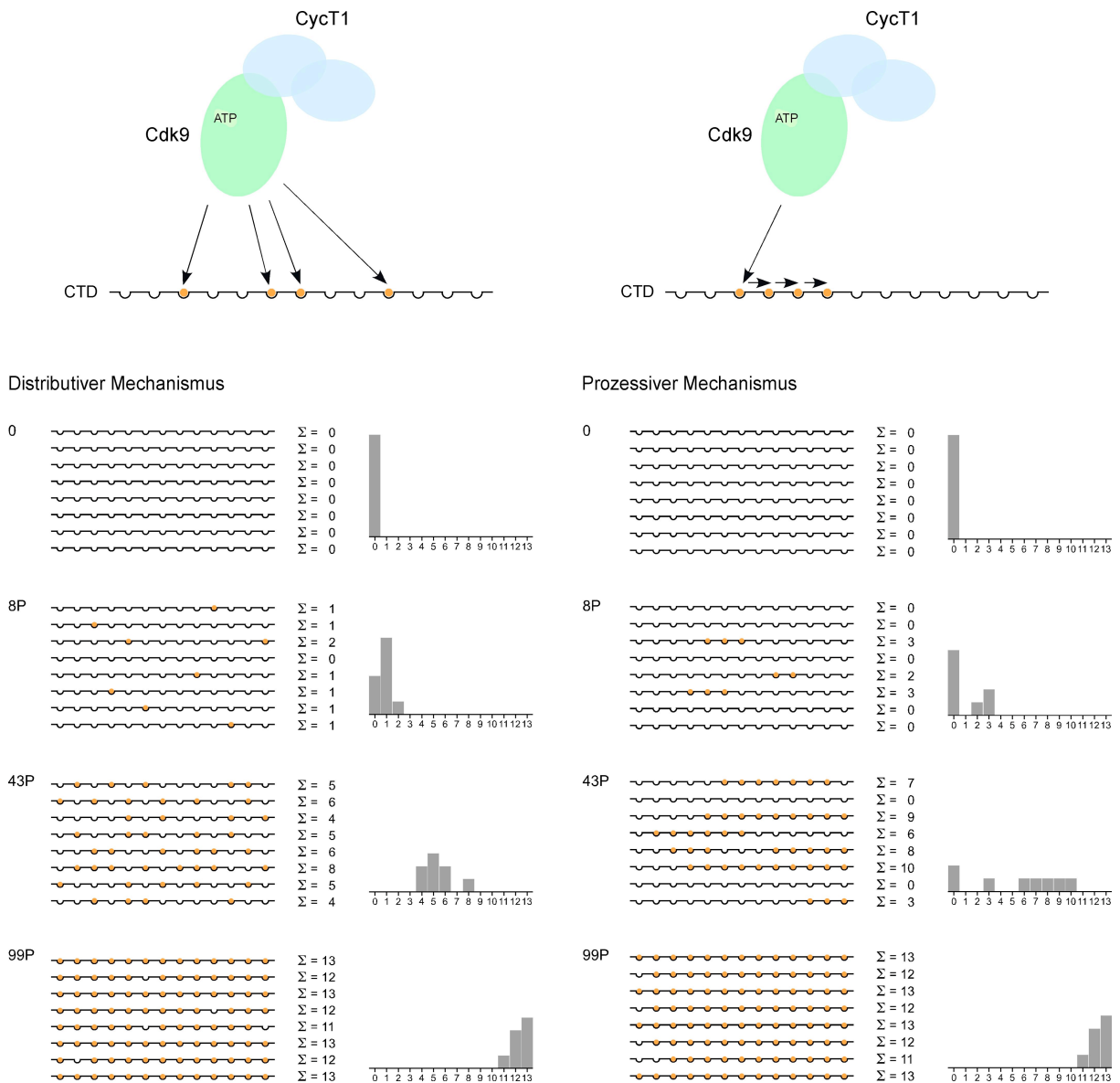


Abbildung 49: Modell der distributiven und prozessiven Phosphorylierung eines Substrats mit mehreren Phosphorylierungsstellen, wie z.B. der RNA-Pol II CTD. Die möglichen Phosphorylierungsstellen der Substrate, hier als Ketten dargestellt, sind durch Einbuchtungen angedeutet. Die Kugeln sollen bereits phosphorylierte Substrat-Stellen kennzeichnen. Die Anzahl der Phosphorylierungen pro Substratmolekül ist rechts neben den Substraten angegeben. Für jedes Modell sind vier Zustände mit einer unterschiedlichen Gesamtzahl an Phosphorylierungen gezeigt. In dem jeweiligen Histogramm ist das Vorkommen verschieden phosphorylierter Substrate zu der Gesamtzahl der Phosphorylierungen dargestellt.

Die RNA-Pol II CTD wird durch drei Cdk-Cyclin Paare an unterschiedlichen Positionen phosphoryliert. Neben der Aminosäureposition, die von diesen Kinasen phosphoryliert werden, unterscheiden sich die Kinasen ebenfalls hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Heptadwiederholungen (Pinhero et al., 2004). So wurde beschrieben, dass Cdk9 (und Cdk8) vornehmlich die Konsensuswiederholungen 1-25 im N-terminalen Teil der CTD phosphoryliert. Cdk7 hingegen phosphoryliert ebenso gut Konsensus- wie nicht Konsensuswiederholungen, letztere sind vornehmlich in der C-terminalen Region der CTD lokalisiert (Chapman et al., 2008). Unklar ist bis heute, wie die Spezifität dieser Phosphorylierungen zustande kommt. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass die unphosphorylierte Form der CTD mit DNA interagiert (Lolli, 2009). Lolli schlug mit Hilfe von

*Docking*studien einen Mechanismus vor, nach welchem Tyrosin1 der CTD derart mit der DNA interkaliert ist, dass nur Serin5 für die Phosphorylierung durch Cdk7 zugänglich ist. Diese Phosphorylierung führt aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zu einem Lösen der CTD von der DNA und erlaubt nun die Phosphorylierung von Serin2 durch Cdk9. Weitere Untersuchungen zur Bestätigung dieses Mechanismus sind notwendig. Von großem Interesse wäre zudem die Aufklärung der Struktur eines P-TEFb-CTD Komplexes, bisher konnte jedoch noch keine Struktur einer CTD phosphorylierenden Kinase mit ihrem Substrat gelöst werden. Eine weitere Fragestellung ist, ob die Histidin-reiche Region in Cyclin T1 ähnlich der RxL-Bindungsstelle der Zellzyklus-Cycline eine Substratbindung vermittelt und die CTD hierdurch in die Nähe der katalytischen Untereinheit bringt. Taube et al. berichteten, dass die CTD der RNA Pol II mit der Histidin-reichen Region wechselwirkt (Taube et al., 2002). Eine Bindung zwischen Cyclin T1 321-566 und einem neun Heptad-langen GST-CTD Fusionsprotein konnte in den hier durchgeführten ITC-Messungen jedoch nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist eine gewisse Anzahl von Heptadwiederholungen oder auch eine vorherige Phosphorylierung der CTD notwendig, um eine Bindung an Cyclin T1 zu bewirken.

Kurze Zeit nach der Identifizierung von Cyclin T1 wurde beobachtet, dass die Konzentration dieses Cyclins während der Zellzyklusprogression konstant ist und keine oszillierenden Schwankungen aufweist, wie es für die Zellzyklus-Cycline charakteristisch ist und namensgebend war (Garriga et al., 1998). Auch Cdk9 besitzt ein gleichbleibendes Expressionsniveau während des Zellzyklus (Garriga et al., 2003). Aus diesem Grund ist es offensichtlich, dass die Aktivität von P-TEFb streng reguliert werden muss. Dazu tragen sowohl die Assoziation mit positiven und negativen Regulatoren als auch posttranslationale Modifikationen der Proteine bei. In dieser Arbeit wurden die negativen Regulatoren Hexim1 und Hexim2 sowie die 7SK snRNA untersucht und ein minimal, inhibierter Komplex identifiziert. Im zellulären Kontext sind neben den Hexim-Homologen und der RNA die Proteine BCDIN3 und Larp7 weitere Bestandteile dieses inaktiven Komplexes. Die Integrität dieses großen Komplexes ist essentiell für die Entwicklung von Vertebraten. Zudem ist P-TEFb nicht nur an der Regulation der Transkriptionselongation beteiligt, sondern verknüpft diesen Prozess auch mit alternativen *Splicen* von mRNA (Barboric et al., 2009). Die Untersuchung der molekularen Interaktionen innerhalb dieses inaktiven Komplexes wird deshalb Thema künftiger Studien sein.

6 Anhang

6.1 Herleitung der Formel für die Auswertung der ITC-Experimente

Für die Bindung eines Liganden L an einen Interaktionspartner M kann die Assoziationsgleichgewichtskonstante K folgendermaßen ausgedrückt werden.

$$K = \frac{\nu}{(1-\nu)[L]}$$

Formel 3: [L] stellt die Konzentration des freien Liganden in M dar. ν ist der Anteil der mit dem Liganden L besetzten Bindungsstellen (Bindungsgrad) und K die Assoziationskonstante in M^{-1} .

Für die Massenbilanz des Liganden gilt:

$$[L]_0 = [L] + n\nu[M]_0$$

Formel 4: $[L]_0$ und $[M]_0$ sind die Gesamtkonzentration des Liganden L bzw. des Bindungspartners M in Molar. Die Zahl der Bindungsstellen des Proteins wird durch den Wert n angegeben.

Die Kombination der Formel 3 und Formel 4 ergibt:

$$\nu^2 - \nu \left(1 + \frac{[L]_0}{n[M]_0} + \frac{1}{nK[M]_0} \right) + \frac{[L]_0}{n[M]_0} = 0 \quad (\text{Formel 5})$$

Der gesamte Wärmehalt Q der Lösung im Volumen V_0 bei einem Bindungsgrad ν ist gegeben durch:

$$Q = n\nu[M]_0 \Delta H V_0$$

Formel 6: Q ist die Wärmemenge in J, ΔH die Bindungsenthalpie in $J \text{ mol}^{-1}$ und V_0 das Volumen der Messzelle.

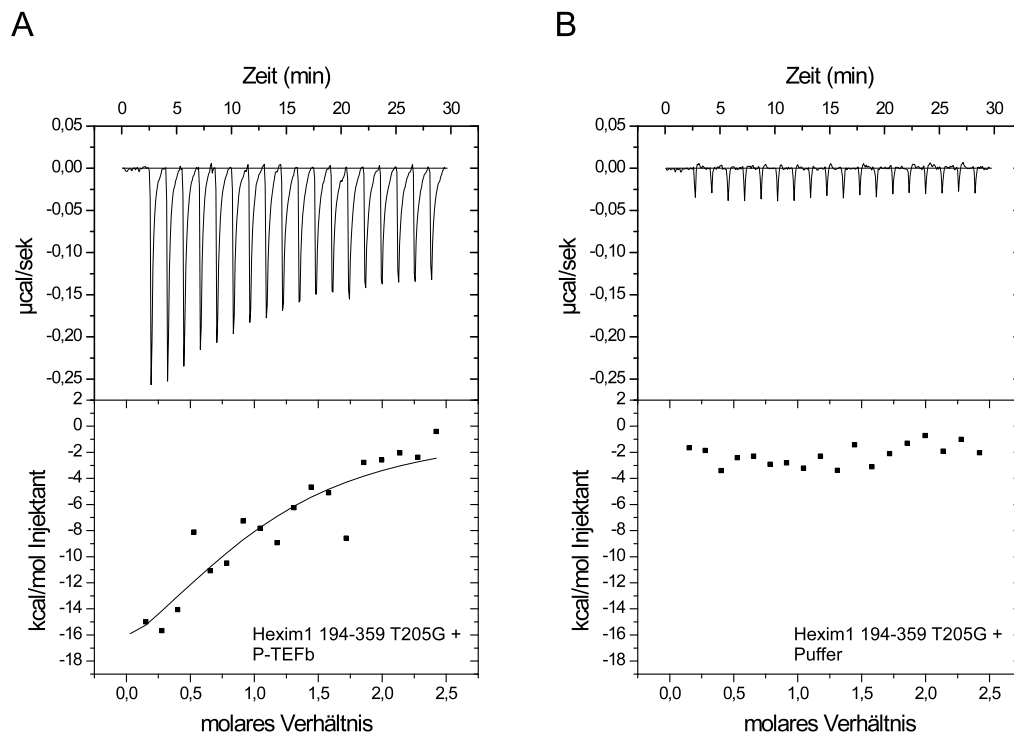
Auflösung der Formel 5 nach ν und Einsetzen in Formel 6 liefert:

$$Q = \frac{n[M]_0 \Delta H V_0}{2} \left(1 + \frac{[L]_0}{n[M]_0} + \frac{1}{nK[M]_0} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_0}{n[M]_0} + \frac{1}{nK[M]_0} \right)^2 - \frac{4[L]_0}{n[M]_0}} \right)$$

Formel 7

Durch Anpassen der Formel 7 an die Wärmemenge können die Werte für K, ΔH und n erhalten werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Origin 7.0.

6.2 Isotherme Titrationskalorimetrie zwischen P-TEFb und Hexim1 194-359 T205G



Titrationsschema	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	K_d (μM)	molares Verhältnis n
Hexim1 194-359 T205G zu P-TEFb	-7,5	-25,3	-17,8	2,3	1

Abbildung 50: Einfluss des PYNT-Motivs auf die Interaktion von Hexim1 mit P-TEFb. Verwendet wurde ein Puffer mit 50 mM HEPES pH 7,6, 250 mM NaCl, 5% Glycerol und 5 mM β -ME.

6.3 Molekulargewichte der dargestellten Proteine

Protein	Theoretisches Mol.gewicht. (Da)	Gemessenes Mol.gewicht (Da)	pI
Hexim1 (1-359)	40751,5	40752,0	4,8
Hexim1 (110-359)	29270,3	29269,0	5,2
His-Hexim1 (164-359, G257C, C297S)	26288,8	26106,2	4,9
Hexim1 (194-359)	19243,9	19244,0	4,5
Hexim1 (194-359, ΔF194, Q198C, C297S)	19202,8	19204,0	4,5
Hexim1 (194-359, ΔF194, G257C, C297S)	19273,9	19275,0	4,5
His-Hexim1 (210-359, G257C, C297S)	20464,0	20365,0	4,6
Hexim1 (255-359, G256A)	12661,0	12662,3	4,9
Hexim1 (1-254, T171A)	28208,6	28217,0	4,8
Hexim1 (194-359, ΔF194, Y203G)	19137,8	19140,9	4,5
Hexim1 (194-359, PYNT zu G)	18996,6	18998,8	4,5
Hexim1 (194-359, Y2303W)	19266,9	19269,0	4,5
Hexim1 (194-359, T205G)	19199,8	19202,0	4,5
Hexim1 (200-359, V200M)	18663,2	18663,4	4,4
His-Hexim2 (174-286)	16604,0	16472,6	5,5
His-Hexim2 (194-286)	15603,0	15473,2	5,6
Hexim2 (192-286)	11680,8	11650,3	5,0
His-Hexim2 (207-286)	12778,0	12647,9	5,7
Cyclin T1 (1-272, R77Q)	32122,6	32121,0	6,9
Cyclin T1 (321-511)	21528,3	21527,0	9,4
Cyclin T1 (384-566)	20790,1	19586 + 20317	9,7
Cyclin T1 (384-511)	14681,6	14681,1	9,4
¹⁵ N-CyclinT1 (384-511)	14874,6	14870,0	9,4
CyclinT2 (1-281, S205)	32252,2	32250,0	8,1
Tat (1-86)	9921,2	9921,6	9,8
Cdk9 (1-372)	42905,6	42985,0	9,0
Cdk9 (1-340)	39090,5	39086,0	8,7
CyclinT1 (1-271-H ₆ , R77Q)	32262,7	32310,0	6,8
KCTD 9x	6976,5	6976,1	9,8
GST-KCTD 9x	34063,9	34065,0	8,1
GST-CTD 3x	29595,0	29595,0	5,9
GST-CTD 5x	31034,5	31060,0	5,9
GST-CTD 13x	36792,5	36789,0	5,9
Importin α (72-499)	46479,5	46480,0	5,1

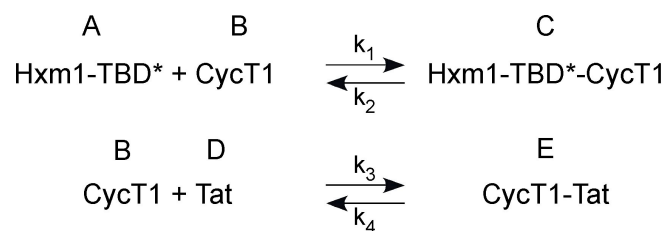
Tabelle 3: Angabe der berechneten und ermittelten Molekulargewichte der in dieser Arbeit dargestellten Proteine. Alle Molekulargewichte wurden mit Hilfe des Internetprogramms ProtParam des ExPASy Servers ausgerechnet (<http://expasy.org>). Die Bestimmung erfolgte mittels ESI-MS, nur im Falle von Hexim2 (192-286) und His-Hexim (164-359) wurde MALDI-MS angewendet.

6.4 Fluoreszenz-Kompetitionsexperiment-Eingabeskript

Dieses Skript wurde für die Analyse des Fluoreszenz-Kompetitionsexperiments mit Tat, Hexim1 und Cyclin T1 unter Benutzung des Programms Scientist (MicroMath, Saint Louis, Missouri, USA) verwendet.

```
//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
//Parameterwerte
K1=3.5
K2=12.41
K3=3.8
K4=10
Ya=0.2951
Yc=0.6328
//Anfangsbedingungen
t=0.000
A=1.5
B=1.5
C=1.0
D=5
E=0
```

Dem Modell liegen die folgenden Gleichgewichte zugrunde:



Für die Auswertung wurden die Parameter K1 und K2 sowie die Parameter Ya und Yc von Antje Schulte übernommen. Ya und Yc beschreiben die Fluoreszenz der freien Hxm1-TBD* bzw. des Cyclin T1 gebundenen Proteins.

7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CAK	Cdk-aktivierende Kinase (<i>Cdk activating kinase</i>)
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
CTD	Carboxy-terminale Domäne (<i>carboxy terminal domain</i>)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cyc	Cyclin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DRB	5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol
EEC	früher Elongationskomplex (<i>early elongation complex</i>)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (<i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
h	human
Hexim1	HMBA induzierbares Protein (<i>HMBA inducible protein 1</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMBA	Hexamethylen-Bisacetamid
hnRNP	heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>)
HSQC	Heteronukleare Einquantenkohärenz (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
IPTG	Isopropyl-1- β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>)
LTR	long terminal repeat
M	mol/l, molar
ml	Milliliter
min	Minute
μ M	μ mol/l, mikromolar
ncRNA	nicht codierende Ribonukleinsäure (<i>non coding ribonucleic acid</i>)
nM	nmol/l, nanomolar
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)

nt	Nukleotid
NTA	Nickel-Nitrilo-tri-essigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PIC	Pre-Initiationskomplex (<i>preinitiation complex</i>)
Pol	Polymerase
P-TEFb	Positiver Transkriptionselongationsfaktor b (<i>positive transcription elongation factor b</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SH2	<i>Src-homology 2</i>
siRNA	small interfering RNA
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure (<i>small nuclear ribonucleic acid</i>)
Tat	Transaktivator der Transkription (<i>transcriptional transactivator</i>)
TAR RNA	Transactivation response <i>RNA</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco etch virus
TF	Transkriptionsfaktor
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

8 Literaturverzeichnis

- Adkins, J.N., and Lumb, K.J. (2002). Intrinsic structural disorder and sequence features of the cell cycle inhibitor p57Kip2. *Proteins* **46**, 1-7.
- Anand, K., Schulte, A., Fujinaga, K., Scheffzek, K., and Geyer, M. (2007). Cyclin box structure of the P-TEFb subunit cyclin T1 derived from a fusion complex with EIAV tat. *J Mol Biol* **370**, 826-836.
- Anand, K., Schulte, A., Vogel-Bachmayr, K., Scheffzek, K., and Geyer, M. (2008). Structural insights into the cyclin T1-Tat-TAR RNA transcription activation complex from EIAV. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1287-1292.
- Armache, K.J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6964-6968.
- Armache, K.J., Mitterweger, S., Meinhart, A., and Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem* **280**, 7131-7134.
- Barboric, M., Kohoutek, J., Price, J., Blazek, D., Price, D., and Peterlin, B. (2005). Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *EMBO J* **24**, 4291-4303.
- Barboric, M., Lenasi, T., Chen, H., Johansen, E.B., Guo, S., and Peterlin, B.M. (2009). 7SK snRNP/P-TEFb couples transcription elongation with alternative splicing and is essential for vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7798-7803.
- Barboric, M., Nissen, R., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **8**, 327-337.
- Barboric, M., and Peterlin, B.M. (2005). A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol* **3**, e76.
- Barrandon, C., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Labas, V., and Bensaude, O. (2007). The transcription-dependent dissociation of P-TEFb-HEXIM1-7SK RNA relies upon formation of hnRNP-7SK RNA complexes. *Mol Cell Biol* **27**, 6996-7006.
- Batchelder, C., Dunn, M.A., Choy, B., Suh, Y., Cassie, C., Shim, E.Y., Shin, T.H., Mello, C., Seydoux, G., and Blackwell, T.K. (1999). Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1. *Genes Dev* **13**, 202-212.
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A., Debreczeni, J., Knapp, S., and Johnson, L. (2008). The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO J* **27**, 1907-1918.
- Becker, R., Loll, B., and Meinhart, A. (2008). Snapshots of the RNA processing factor SCAF8 bound to different phosphorylated forms of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **283**, 22659-22669.
- Belanger, F., Baigude, H., and Rana, T.M. (2009). U30 of 7SK RNA forms a specific photo-cross-link with Hexim1 in the context of both a minimal RNA-binding site and a fully reconstituted 7SK/Hexim1/P-TEFb ribonucleoprotein complex. *J Mol Biol* **386**, 1094-1107.
- Bolanos-Garcia, V.M., and Davies, O.R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1304-1313.

- Brown, N.R., Noble, M.E., Endicott, J.A., Garman, E.F., Wakatsuki, S., Mitchell, E., Rasmussen, B., Hunt, T., and Johnson, L.N. (1995). The crystal structure of cyclin A. *Structure* 3, 1235-1247.
- Brown, N.R., Noble, M.E., Endicott, J.A., and Johnson, L.N. (1999). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1, 438-443.
- Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nat Struct Biol* 10, 679-680.
- Byers, S., Price, J., Cooper, J., Li, Q., and Price, D. (2005). HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *J Biol Chem* 280, 16360-16367.
- Chao, S., and Price, D. (2001). Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem* 276, 31793-31799.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Albert, T.K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318, 1780-1782.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* 24, 289-296.
- Chapman, R.D., Palancade, B., Lang, A., Bensaude, O., and Eick, D. (2004). The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability. *Nucleic Acids Res* 32, 35-44.
- Chen, R., Yang, Z., and Zhou, Q. (2004). Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA. *J Biol Chem* 279, 4153-4160.
- Chen, Y.N., Sharma, S.K., Ramsey, T.M., Jiang, L., Martin, M.S., Baker, K., Adams, P.D., Bair, K.W., and Kaelin, W.G., Jr. (1999). Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4325-4329.
- Cheng, K.Y., Noble, M.E., 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. *J Biol Chem* 281, 23167-23179.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25, 596-601.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M., and Conti, E. (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* 76, 647-671.
- Cramer, P., Armache, K.J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G.E., Dengl, S., Geiger, S.R., Jasiak, A.J., *et al.* (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys* 37, 337-352.
- 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.
- Dames, S., Schönichen, A., Schulte, A., Barboric, M., Peterlin, B., Grzesiek, S., and Geyer, M. (2007). Structure of the Cyclin T binding domain of Hexim1 and molecular basis for its recognition of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14312-14317.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8758-8763.
- Dulac, C., Michels, A., Fraldi, A., Bonnet, F., Nguyen, V., 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.
- Dvir, A. (2002). Promoter escape by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* 1577, 208-223.
- Ebright, R.H. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* 304, 687-698.
- Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24, 280-288.
- Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.
- Egloff, S., Van Herreweghe, E., and Kiss, T. (2006). Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol Cell Biol* 26, 630-642.

- Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S., and Lima, C.D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 11, 1549-1561.
- Florence, B., and Faller, D.V. (2001). You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* 6, D1008-1018.
- Fu, T., Peng, J., Lee, G., Price, D., and Flores, O. (1999). Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* 274, 34527-34530.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B. (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* 24, 787-795.
- Garber, M., Wei, P., KewalRamani, V., Mayall, T., Herrmann, C., Rice, A., Littman, D., and Jones, K. (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 CytT1 protein. *Genes Dev* 12, 3512-3527.
- Garriga, J., Bhattacharya, S., Calbó, J., Marshall, R., Truongcao, M., Haines, D., and Graña, X. (2003). CDK9 is constitutively expressed throughout the cell cycle, and its steady-state expression is independent of SKP2. *Mol Cell Biol* 23, 5165-5173.
- Garriga, J., Peng, J., Parreño, M., Price, D., Henderson, E., and Graña, X. (1998). Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation. *Oncogene* 17, 3093-3102.
- Ghosh, D., and Seydoux, G. (2008). Inhibition of transcription by the *Caenorhabditis elegans* germline protein PIE-1: genetic evidence for distinct mechanisms targeting initiation and elongation. *Genetics* 178, 235-243.
- Giacinti, C., Musarò, A., De Falco, G., Jourdan, I., Molinaro, M., Bagella, L., Simone, C., and Giordano, A. (2008). Cdk9-55: a new player in muscle regeneration. *J Cell Physiol* 216, 576-582.
- Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2006). Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 612-616.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., *et al.* (2008). Protein production and purification. *Nat Methods* 5, 135-146.
- Graña, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P., Rosenblatt, J., Morgan, D., and Giordano, A. (1994). PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3834-3838.
- Gruber, A.R., Koper-Emde, D., Marz, M., Tafer, H., Bernhart, S., Obernosterer, G., Mosig, A., Hofacker, I.L., Stadler, P.F., and Benecke, B.J. (2008). Invertebrate 7SK snRNAs. *J Mol Evol* 66, 107-115.
- Gupta, S., Busch, R.K., Singh, R., and Reddy, R. (1990). Characterization of U6 small nuclear RNA cap-specific antibodies. Identification of gamma-monomethyl-GTP cap structure in 7SK and several other human small RNAs. *J Biol Chem* 265, 19137-19142.
- Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11, 394-403.
- Hahn, S. (2008). Transcriptional regulation. Meeting on regulatory mechanisms in eukaryotic transcription. *EMBO Rep* 9, 612-616.
- Hanks, S., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9, 576-596.
- Hanyu-Nakamura, K., Sonobe-Nojima, H., Tanigawa, A., Lasko, P., and Nakamura, A. (2008). *Drosophila* Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells. *Nature* 451, 730-733.
- Hastie, C.J., McLauchlan, H.J., and Cohen, P. (2006). Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat Protoc* 1, 968-971.
- He, N., Jahchan, N., Hong, E., Li, Q., Bayfield, M., Maraia, R., Luo, K., and Zhou, Q. (2008). A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Mol Cell* 29, 588-599.

- Heitz, F., Morris, M.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Doree, M., and Divita, G. (1997). Interactions of cyclins with cyclin-dependent kinases: a common interactive mechanism. *Biochemistry* **36**, 4995-5003.
- 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 J* **25**, 3100-3109.
- Hoeppner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). Structure of the mediator subunit cyclin C and its implications for CDK8 function. *J Mol Biol* **350**, 833-842.
- Huang, F., Wagner, M., and Siddiqui, M.A. (2004). Ablation of the CLP-1 gene leads to down-regulation of the HAND1 gene and abnormality of the left ventricle of the heart and fetal death. *Mech Dev* **121**, 559-572.
- Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**, 823-829.
- Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Hunter, T., and Sefton, B. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1311-1315.
- Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282.
- Ivanov, D., Kwak, Y.T., Guo, J., and Gaynor, R.B. (2000). Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties. *Mol Cell Biol* **20**, 2970-2983.
- Jackman, M., Firth, M., and Pines, J. (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J* **14**, 1646-1654.
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Thérien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., *et al.* (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* **27**, 262-274.
- Jones, K., and Peterlin, B. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* **63**, 717-743.
- Kadonaga, J.T. (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* **116**, 247-257.
- Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P., Verdin, E., and Ott, M. (2003). Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Mol Cell* **12**, 167-176.
- Kaldis, P. (1999). The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* **55**, 284-296.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., and Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* **436**, 876-880.
- Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S., and Sowadski, J.M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-414.
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 417-425.
- Kohoutek, J., Li, Q., Blazek, D., Luo, Z., Jiang, H., and Peterlin, B.M. (2009). Cyclin T2 is essential for mouse embryogenesis. *Mol Cell Biol* **29**, 3280-3285.
- Kornberg, R.D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* **30**, 235-239.
- Krebs, E.G., Graves, D.J., and Fischer, E.H. (1959). Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J Biol Chem* **234**, 2867-2873.
- Kreegipuu, A., Blom, N., Brunak, S., and Jarv, J. (1998). Statistical analysis of protein kinase specificity determinants. *FEBS Lett* **430**, 45-50.
- Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I., and Wright, P.E. (1996). Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11504-11509.
- Krueger, B., Jeronimo, C., Roy, B., Bouchard, A., Barrandon, C., Byers, S., Searcey, C., Cooper, J., Bensaude, O., Cohen, E., *et al.* (2008). LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic Acids Res* **36**, 2219-2229.

- Lacy, E.R., Filippov, I., Lewis, W.S., Otieno, S., Xiao, L., Weiss, S., Hengst, L., and Kriwacki, R.W. (2004). p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat Struct Mol Biol* 11, 358-364.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., and Chook, Y.M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126, 543-558.
- Levine, M., and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.
- Li, Q., Cooper, J., Altwerger, G., Feldkamp, M., Shea, M., and Price, D. (2007). HEXIM1 is a promiscuous double-stranded RNA-binding protein and interacts with RNAs in addition to 7SK in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 35, 2503-2512.
- Li, Q., Price, J., Byers, S., Cheng, D., Peng, J., and Price, D. (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.
- Lolli, G. (2009). Binding to DNA of the RNA-polymerase II C-terminal domain allows discrimination between Cdk7 and Cdk9 phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 37, 1260-1268.
- Lowe, E.D., Tews, I., Cheng, K.Y., Brown, N.R., Gul, S., Noble, M.E., Gamblin, S.J., and Johnson, L.N. (2002). Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A. *Biochemistry* 41, 15625-15634.
- Lu, H., Flores, O., Weinmann, R., and Reinberg, D. (1991). The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10004-10008.
- Manning, G., Whyte, D., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Markert, A., Grimm, M., Martinez, J., Wiesner, J., Meyerhans, A., Meyuhass, O., Sickmann, A., and Fischer, U. (2008). The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep* 9, 569-575.
- Marshall, N., Peng, J., Xie, Z., and Price, D. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* 271, 27176-27183.
- Marshall, N., and Price, D. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem* 270, 12335-12338.
- Marshall, N.F., and Price, D.H. (1992). Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* 12, 2078-2090.
- Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* 430, 223-226.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19, 1401-1415.
- Michels, A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T., Bonnet, F., Nguyen, V., Sedore, S., Price, J., Price, D., Lania, L., *et al.* (2004). Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J* 23, 2608-2619.
- Michels, A., Nguyen, V., 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.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Naar, A.M., Lemon, B.D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 70, 475-501.
- Napolitano, G., Licciardo, P., Carbone, R., Majello, B., and Lania, L. (2002). CDK9 has the intrinsic property to shuttle between nucleus and cytoplasm, and enhanced expression of cyclin T1 promotes its nuclear localization. *J Cell Physiol* 192, 209-215.
- Napolitano, G., Majello, B., and Lania, L. (2003). Catalytic activity of Cdk9 is required for nuclear co-localization of the Cdk9/cyclin T1 (P-TEFb) complex. *J Cell Physiol* 197, 1-7.
- Narita, T., Yamaguchi, Y., Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., *et al.* (2003). Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol Cell Biol* 23, 1863-1873.

- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Nguyen, V., Kiss, T., Michels, A., and Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322-325.
- Noble, C.G., Hollingworth, D., Martin, S.R., Ennis-Adeniran, V., Smerdon, S.J., Kelly, G., Taylor, I.A., and Ramos, A. (2005a). Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD. *Nat Struct Mol Biol* 12, 144-151.
- Noble, M., Barrett, P., Endicott, J., Johnson, L., McDonnell, J., Robertson, G., and Zawaira, A. (2005b). Exploiting structural principles to design cyclin-dependent kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1754, 58-64.
- Noble, M.E., Endicott, J.A., and Johnson, L.N. (2004). Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303, 1800-1805.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15, 661-675.
- Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-451.
- Ouchida, R., Kusuhara, M., Shimizu, N., Hisada, T., Makino, Y., Morimoto, C., Handa, H., Ohsuzu, F., and Tanaka, H. (2003). Suppression of NF-kappaB-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells. *Genes Cells* 8, 95-107.
- 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 TFIIIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15036-15041.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821-828.
- Payne, J.M., and Dahmus, M.E. (1993). Partial purification and characterization of two distinct protein kinases that differentially phosphorylate the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase subunit IIa. *J Biol Chem* 268, 80-87.
- Peeper, D.S., Parker, L.L., Ewen, M.E., Toebes, M., Hall, F.L., Xu, M., Zantema, A., van der Eb, A.J., and Piwnicka-Worms, H. (1993). A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *EMBO J* 12, 1947-1954.
- Peng, J., Marshall, N., and Price, D. (1998a). Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb. *J Biol Chem* 273, 13855-13860.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J., and Price, D. (1998b). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 12, 755-762.
- Peterlin, B., and Price, D. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23, 297-305.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.
- Pinhero, R., Liaw, P., Bertens, K., and Yankulov, K. (2004). Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. *Eur J Biochem* 271, 1004-1014.
- Pinna, L.A., and Ruzzene, M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim Biophys Acta* 1314, 191-225.
- Prasanth, K.V., and Spector, D.L. (2007). Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum. *Genes Dev* 21, 11-42.
- Price, D. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 20, 2629-2634.
- Richter, S., Cao, H., and Rana, T. (2002). Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation. *Biochemistry* 41, 6391-6397.
- Rougvie, A.E., and Lis, J.T. (1988). The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54, 795-804.
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., *et al.* (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* 3, 696-700.

- 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 p16INK4a. *Nature* **395**, 237-243.
- Sano, M., Abdellatif, M., Oh, H., Xie, M., Bagella, L., Giordano, A., Michael, L., DeMayo, F., and Schneider, M. (2002). Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat Med* **8**, 1310-1317.
- Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 557-567.
- Schulman, B.A., Lindstrom, D.L., and Harlow, E. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10453-10458.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schönichen, A., Blazek, D., Peterlin, B., 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.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M., and Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 473-483.
- Seydoux, G., Mello, C.C., Pettitt, J., Wood, W.B., Priess, J.R., and Fire, A. (1996). Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* **382**, 713-716.
- Shimizu, N., Ouchida, R., Yoshikawa, N., Hisada, T., Watanabe, H., Okamoto, K., Kusuhara, M., Handa, H., Morimoto, C., and Tanaka, H. (2005). HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8555-8560.
- Shore, S., Byers, S., Dent, P., and Price, D. (2005). Characterization of Cdk9(55) and differential regulation of two Cdk9 isoforms. *Gene* **350**, 51-58.
- Shore, S., Byers, S., Maury, W., and Price, D. (2003). Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene* **307**, 175-182.
- Sims, R.J., 3rd, Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* **18**, 2437-2468.
- Stachora, A.A., Schafer, R.E., Pohlmeier, M., Maier, G., and Ponstingl, H. (1997). Human Supt5h protein, a putative modulator of chromatin structure, is reversibly phosphorylated in mitosis. *FEBS Lett* **409**, 74-78.
- Steitz, T.A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**, 231-232.
- Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 195-208.
- Stiller, J.W., and Cook, M.S. (2004). Functional unit of the RNA polymerase II C-terminal domain lies within heptapeptide pairs. *Eukaryot Cell* **3**, 735-740.
- Takeda, D.Y., Wohlschlegel, J.A., and Dutta, A. (2001). A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* **276**, 1993-1997.
- Tamm, I., Kikuchi, T., Darnell, J.E., Jr., and Salditt-Georgieff, M. (1980). Short capped hnRNA precursor chains in HeLa cells: continued synthesis in the presence of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole. *Biochemistry* **19**, 2743-2748.
- Taube, R., Lin, X., Irwin, D., Fujinaga, K., and Peterlin, B. (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. *Mol Cell Biol* **22**, 321-331.
- Turano, M., Napolitano, G., Dulac, C., Majello, B., Bensaude, O., and Lania, L. (2006). Increased HEXIM1 expression during erythroleukemia and neuroblastoma cell differentiation. *J Cell Physiol* **206**, 603-610.
- Ubersax, J.A., and Ferrell, J.E., Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 530-541.
- Van Herreweghe, E., Egloff, S., Goiffon, I., Jády, B., Froment, C., Monsarrat, B., and Kiss, T. (2007). Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb. *EMBO J* **26**, 3570-3580.
- Verdecia, M.A., Bowman, M.E., Lu, K.P., Hunter, T., and Noel, J.P. (2000). Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* **7**, 639-643.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., *et al.* (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor

- that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12, 343-356.
- Wang, S., and Fischer, P. (2008). Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol Sci* 29, 302-313.
- Wassarman, D.A., and Steitz, J.A. (1991). Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein (RNP), the most abundant human small RNP of unknown function. *Mol Cell Biol* 11, 3432-3445.
- Wei, P., Garber, M., Fang, S., Fischer, W., and Jones, K. (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.
- 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.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32, W668-673.
- Wimmer, J., Fujinaga, K., Taube, R., Cujec, T., Zhu, Y., Peng, J., Price, D., and Peterlin, B. (1999). Interactions between Tat and TAR and human immunodeficiency virus replication are facilitated by human cyclin T1 but not cyclins T2a or T2b. *Virology* 255, 182-189.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 179, 131-137.
- Wittmann, B., Fujinaga, K., Deng, H., Ogba, N., and Montano, M. (2005). The breast cell growth inhibitor, estrogen down regulated gene 1, modulates a novel functional interaction between estrogen receptor alpha and transcriptional elongation factor cyclin T1. *Oncogene* 24, 5576-5588.
- Wittmann, B.M., Wang, N., and Montano, M.M. (2003). Identification of a novel inhibitor of breast cell growth that is down-regulated by estrogens and decreased in breast tumors. *Cancer Res* 63, 5151-5158.
- Wright, T.J., Costa, J.L., Naranjo, C., Francis-West, P., and Altherr, M.R. (1999). Comparative analysis of a novel gene from the Wolf-Hirschhorn/Pitt-Rogers-Danks syndrome critical region. *Genomics* 59, 203-212.
- Wu, S., and Chiang, C. (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 282, 13141-13145.
- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* 21, 227-237.
- Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., and Handa, H. (2002). Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol* 22, 2918-2927.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41-51.
- Yang, Z., Zhu, Q., Luo, K., and Zhou, Q. (2001). The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 414, 317-322.
- Ye, Q., Hu, Y.F., Zhong, H., Nye, A.C., Belmont, A.S., and Li, R. (2001). BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol* 155, 911-921.
- Yik, J., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J., Link, A., and Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* 12, 971-982.
- Yik, J., Chen, R., Pezda, A., Samford, C., 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.
- Yik, J., Chen, R., Pezda, A., 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.

- Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* *408*, 225-229.
- Zhang, J., Tamilarasu, N., Hwang, S., Garber, M., Huq, I., Jones, K., and Rana, T. (2000). HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *J Biol Chem* *275*, 34314-34319.
- Zhou, M., Huang, K., Jung, K., Cho, W., Klase, Z., Kashanchi, F., Pise-Masison, C., and Brady, J. (2009). Bromodomain protein Brd4 regulates human immunodeficiency virus transcription through phosphorylation of CDK9 at threonine 29. *J Virol* *83*, 1036-1044.
- Zhou, Q., and Yik, J. (2006). The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 646-659.
- Zhu, G., Fujii, K., Belkina, N., Liu, Y., James, M., Herrero, J., and Shaw, S. (2005). Exceptional disfavor for proline at the P + 1 position among AGC and CAMK kinases establishes reciprocal specificity between them and the proline-directed kinases. *J Biol Chem* *280*, 10743-10748.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M., and Price, D. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* *11*, 2622-2632.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* *31*, 3406-3415.

Danksagung

Ich danke

Prof. Dr. Roger S. Goody

PD Dr. Matthias Geyer

Prof. Dr. Martin Engelhard

Prof. Dr. Roland Winter

Karin Vogel-Bachmayr

Sascha Baumann, Nathalie Bleimling, Petra Janning, Martina Wischnewski und Sabine Wohlgemuth

André, Antje, Barbara, Bernhard, Diana, Florian H, Florian K, Friederike, Holger, Jana, Janna, Karl-Heinz, Santiago, Sebastian sowie Aymelt und Janina

der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der chemischen Industrie e.V.

Eidesstattliche Erklärung

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

Datum/Unterschrift