

LARP7 – ein La ähnliches Protein reguliert die  
Elongation der PolII Transkription durch das  
7SK RNP

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Andreas Markert  
aus Saal an der Saale

Würzburg 2009

Eingereicht am \_\_\_\_\_  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer  
2. Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner  
der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. Utz Fischer  
2. Prüfer: Prof. Dr. Erich Buchner  
3. Prüfer: Prof. Dr. med Holger Höhn  
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

Wissen kann man mitteilen,  
Weisheit aber nicht. Man  
kann sie finden, man kann  
sie leben, man kann von ihr  
getragen werden, man kann  
mit ihr Wunder tun, aber  
sagen und lehren kann man  
sie nicht.

Hermann Hesse, Siddhartha



Diese Arbeit wurde angefertigt

in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fischer am  
Lehrstuhl für Biochemie der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Teile dieser Arbeit gehen in folgende Veröffentlichung ein:

Markert, A., M. Grimm, et al. (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**(6): 569-75.

*für Eva*



## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>13</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>17</b>
2.1 Die eukaryotische PolII Transkription – von der Initiation zur Elongation .....	17
2.1.1 Die Initiation der Transkription.....	18
2.1.2 Die Elongation - Promoter escape und promoter proximal pausing .....	20
2.2 Der positive Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb .....	23
2.2.1 P-TEFb reguliert die Transkription der Mehrzahl aller mRNAs ....	24
2.2.2 HIV-1 nutzt P-TEFb als wirtseigenen Kofaktor der Transkription .....	25
2.3 Die Regulation der zellulären P-TEFb Aktivität .....	28
2.3.1 Die positive Regulation von P-TEFb durch Brd4.....	29
2.3.2 7SK RNA, HEXIM1/2 und P-TEFb – das 7SK RNP.....	31
2.4 Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen P-TEFb und 7SK RNP reguliert Zellwachstum und Differenzierung .....	34
2.5 Problemstellung und Konzeption .....	37
<b>3 Material .....</b>	<b>39</b>
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	39
3.1.1 Chromatographische Matrices .....	39
3.1.2 Längenstandards.....	39
3.1.3 Reaktions-Sets (Kits).....	40
3.1.4 Dialyse- und Filtermaterial .....	41
3.1.5 Kunststoffwaren und -gefäße .....	41
3.1.6 Röntgenfilme und Screens .....	41
3.1.7 Transfermembranen .....	42
3.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	42
3.2.1 Allgemeine Lösungen .....	42
3.2.2 Gelelektrophoresepuffer .....	48
3.2.3 Probenpuffer .....	49
3.2.4 Medien und Zusätze für die Gewebekultur.....	50
3.2.4.1 Medienzusammensetzungen.....	50
3.2.5 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur .....	51
3.2.5.1 Medienzusammensetzungen.....	51
3.3 Oligonukleotide .....	52
3.4 Plasmide.....	52

3.5 Antikörper .....	53
3.6 Organismen und Zelllinien.....	54
<b>4 Methoden.....</b>	<b>55</b>
4.1 Methoden der Gentechnik und Molekularbiologie .....	55
4.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	55
4.1.1.1 Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren.....	55
4.1.1.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	55
4.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	55
4.1.2 Methoden zur DNA-Präparation und -Analyse .....	56
4.1.2.1 Isolierung von Plasmid- DNA.....	56
4.1.2.2 Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	56
4.1.3 Gerichtete in vitro Mutagenese.....	57
4.1.3.1 Sequenzierung von DNA mit „AmpliTag polymerase FS Big Dye Terminator“ .....	57
4.1.3.2 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen ..	58
4.1.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase .....	58
4.1.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	58
4.1.3.5 Präparation kompetenter Bakterienzellen .....	58
4.1.3.6 Transformation kompetenter Bakterienzellen .....	59
4.1.3.7 Anlegen von E. coli Glycerol-Kulturen .....	59
4.1.3.8 Kolonie-PCR-Analyse.....	59
4.1.4 Reverse Transkription (RT-PCR) .....	60
4.1.5 Quantitative Real-Time PCR.....	61
4.2 Biochemische Methoden.....	62
4.2.1 Grundlegende Methoden der Protein-Biochemie .....	62
4.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	62
4.2.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	62
4.2.1.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	62
4.2.1.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	63
4.2.1.5 Autoradiographie von Elektrophoresegelen .....	63
4.2.2 Immunologische und Immunbiochemische Methoden .....	64
4.2.2.1 Western-Blotting und reversible Färbung mit Amdioschwarz oder Ponceau S .....	64
4.2.2.2 Immunoblot-Analyse.....	65
4.2.2.3 Immunpräzipitation von Proteinen .....	65
4.2.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie .....	66

4.2.2.5 Gewinnung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren .....	67
4.2.3 Proteinexpression und -reinigung .....	67
4.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine in E. coli .....	67
4.2.3.2 Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen .....	68
4.2.3.3 Dialyse von Proteinen und Proteinkomplexen.....	69
4.2.4 Gekoppelte in vitro-Transkription und Translation .....	69
4.2.5 Methoden zur RNA-Präparation und Analyse.....	69
4.2.5.1 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese .....	69
4.2.5.2 Native RNA-Gelelektrophorese.....	70
4.2.5.3 In vitro-Transkription .....	70
4.2.5.4 Reinigung radioaktiv markierter RNA aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen.....	71
4.2.5.5 Phenol-Extraktion von RNA und Protein aus Immunpräzipitaten und Extrakten.....	71
4.2.5.6 5'-Endmarkierung von RNA .....	71
4.2.5.7 Northern-Blot und RNA-Hybridisierung.....	72
4.2.5.8 RNA UV-Crosslink .....	72
4.2.5.9 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) .....	73
4.2.6 Präparation von Zellextrakten .....	73
4.2.6.1 Herstellung von HeLa Gesamtzellextrakt auf Fermenterbasis .....	73
4.2.6.2 Herstellung von HeLa-Kernextrakt .....	74
4.2.6.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen .....	74
4.2.7 In vitro Protein-Bindungsanalyse .....	74
4.2.8 Proteintandemmassenspektrometrie (Protein-MS/MS) .....	75
4.2.9 Tobramycin-Affinitätsreinigung.....	76
Proteinbindung und Elution von der Tobra-Säule.....	77
4.2.10 Dichtegradientenzentrifugation.....	77
4.2.11 Chromatographische Analyse von Zellextrakten – Gelfiltration .....	77
4.2.12 Konzentrieren von Proteinlösungen durch Fällung mit Trichloressigsäure .....	78
4.3 Zellkulturmethoden .....	78
4.3.1 Kultivierung von Säugerzellen .....	78
4.3.2 Bestimmung der Zelldichte .....	79
4.3.3 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen .....	79
4.3.4 DRB-Behandlung von HeLa-Zellen .....	79

4.3.5	Transfektionstechniken .....	80
4.3.5.1	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen.....	80
4.3.5.2	Reduktion der SMN-Expression durch RNA-Interferenz .....	80
4.3.6	Luziferase basierende Reporterstudien .....	81
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>83</b>
5.1	Identifikation eines Oligopyrimidin bindenden Proteins in vitro.....	83
5.1.1	LARP7 assoziiert mit Urdin-reicher RNA .....	83
5.1.2	Das La ähnliche Protein LARP7 ist in Vertebraten hoch konserviert.....	86
5.2	Die zelluläre Lokalisation von LARP7 .....	88
5.3	LARP7 assoziiert spezifisch mit 7SK RNA .....	89
5.4	LARP7 ist ein integraler Bestandteil des 7SK RNP.....	91
5.4.1	LARP7 kofraktioniert mit Komponenten des 7SK RNP.....	91
5.4.2	LARP7 kolokalisiert in proliferierenden HeLa-Zellen mit HEXIM1 und P-TEFb .....	93
5.4.3	Massenspektrometrische Analyse des 7SK RNP.....	95
5.4.4	Die Assoziation von LARP7 mit dem 7SK RNP wird im Wesentlichen durch die RNA vermittelt.....	96
5.4.5	Unter Stressbedingungen dissoziiert LARP7 gemeinsam mit 7SK RNA vom Komplex .....	98
5.5	Multiple Interaktionen innerhalb des 7SK RNP .....	99
5.5.1	LARP7 bindet an HEXIM1 und Cdk9, jedoch nicht an Cyclin T1.....	100
5.5.2	Die La- und RRM1-Domäne von LARP7 sind für die Bindung an das 3'-Ende der 7SK RNA essentiell .....	101
5.5.3	LARP7 konkurriert mit La um die Bindung an 7SK RNA .....	103
5.6	LARP7 übernimmt eine entscheidende Funktion in der PolII vermittelten Transkription .....	104
5.6.1	LARP7 reprimiert die Tat abhängige Transkription von HIV und reguliert die Bildung infektiöser Viruspartikel .....	105
5.6.2	Die Reduktion der LARP7-Expression resultiert in einer signifikanten Steigerung der zellulären Transkription .....	108
5.7	Das <i>D. melanogaster</i> Homolog von LARP7, <i>mxc</i> , wird nicht in einen 7SK RNP ähnlichen Komplex inkorporiert.....	110
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>113</b>
6.1	LARP7 assoziiert spezifisch mit 7SK RNA im Zellkern.....	114

6.2 LARP7 – eine zentrale Komponente des 7SK RNP.....	116
6.3 LARP7, ein Bindeglied zwischen 7SK RNA und P-TEFb.....	117
6.4 Die Interaktion zwischen LARP7 und 7SK RNA bleibt unter Stress stabil und ist Voraussetzung für die Bindung an P-TEFb .....	119
6.5 Obwohl La und LARP7 an 7SK RNA binden, wird nur LARP7 in das RNP inkorporiert .....	121
6.6 LARP7 reguliert die Transkription viraler und zellulärer PolII Gene in vivo.....	124
6.7 Die Dynamik des 7SK RNP – ein Modell seiner Regulation .....	126
6.8 Ausblick .....	130
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>151</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis .....	151
8.2 Aminosäuresequenzen .....	154
8.3 Buchstabensymbole der Aminosäuren und Nukleotide .....	154
Danksagung.....	157
Lebenslauf.....	159
Erklärung .....	160

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1: Modell der Transkriptionsinitiation von RNA PolII.</b> .....	19
<b>Abbildung 2: Promoter proximal pausing.</b> .....	22
<b>Abbildung 3: Untereinheiten und Isoformen von P-TEFb</b> .....	23
<b>Abbildung 4: Transkripte des HI-Virus.</b> .....	26
<b>Abbildung 5: Mechanismus der Tat Transaktivierung.</b> .....	27
<b>Abbildung 6: Sequenz und Struktur der humanen 7SK RNA</b> .....	32
<b>Abbildung 7: (a) Modell des 7SK RNP und (b) Schematische Darstellung der Analogien von TAR und der 3´ Stamm-Schleife von 7SK RNA.</b> .....	34
<b>Abbildung 8: P-TEFb kontrolliert die Transkriptionselongation von PolII.</b> .....	36
<b>Abbildung 9: Identifikation und Aufreinigung eines in vitro 5´-TOP-Motiv bindenden Faktors</b> .....	84
<b>Abbildung 10: LARP7 bindet U-reiche RNA</b> .....	86
<b>Abbildung 11: Schematische Darstellung der konservierten Domänen von LARP7</b> .....	87
<b>Abbildung 12: LARP7 lokalisiert im Zellkern</b> .....	88
<b>Abbildung 13: LARP7 präzipitiert spezifisch 7SK RNA.</b> .....	90
<b>Abbildung 14: LARP7 kosedimentiert mit 7SK RNA, Cdk9 und HEXIM1.</b> .....	91
<b>Abbildung 15: LARP7 eluiert zusammen mit dem 7SK RNP, nicht jedoch mit dem P-TEFb Komplex.</b> .....	92
<b>Abbildung 16: LARP7 kolokalisiert mit HEXIM1 und Cdk9 im Zellkern.</b> .....	94
<b>Abbildung 17: LARP7 ist Bestandteil des 7SK RNP.</b> .....	95
<b>Abbildung 18: 7SK RNA ermöglicht die Bindung von LARP7 an P-TEFb.</b> .....	97
<b>Abbildung 19: Die LARP7 / 7SK RNA Interaktion bleibt unter DRB-Behandlung stabil.</b> .....	99
<b>Abbildung 20: LARP7 bindet an HEXIM1 und C-Terminal an Cdk9.</b> .....	101
<b>Abbildung 21: LARP7 bindet N-terminal an das 3´-Ende von 7SK RNA.</b> .....	102
<b>Abbildung 22: LARP7 ersetzt La am 3´-Ende von 7SK RNA.</b> .....	104
<b>Abbildung 23: LARP7 beeinflusst die Tat abhängige Transkription in vivo.</b> .....	106
<b>Abbildung 24: Knockdown von LARP7 stimuliert die Transkription von PolII.</b> .....	108
<b>Abbildung 25: mxc, das <i>D. melanogaster</i> LARP7 Ortholog bildet keinen 7SK RNP ähnlichen Komplex.</b> .....	111
<b>Abbildung 26: Modell des 7SK RNP</b> .....	118
Abbildung 27: Struktur der La- und RRM1-Domäne des humanen La Proteins in Verbindung mit RNA.....	122
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Regulation des 7SK RNP .....	128
Abbildung 29: Phylogenetische Analyse von Transkriptionselongations-Kontrollfaktoren. ....	131

## 1 Zusammenfassung

Genexpression in Eukaryoten beschreibt einen mehrstufigen Prozess, welcher auf Ebene der Transkription durch den positiven Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb entscheidend reguliert wird. P-TEFb bildet einen heterodimeren Komplex aus der Cyclin abhängigen Kinase 9 und deren Kofaktor Cyclin T1/2. Dieser Komplex aktiviert die Elongation der Transkription durch Phosphorylierung der negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF. Darüber hinaus phosphoryliert P-TEFb Serin2 Reste in der C-terminalen Domäne von RNA PolII und stimuliert so die kotranskriptionelle Prozessierung der synthetisierten prä-mRNA. In Anpassung an unterschiedliche Wachstumsbedingungen wird die Aktivität dieses Faktors durch reversible Interaktion mit 7SK RNA und HEXIM Proteinen innerhalb eines katalytisch inaktiven Ribonukleoproteinpartikels (7SK RNP) streng kontrolliert. Dieses sensible Gleichgewicht zwischen P-TEFb auf der einen und dem 7SK RNP auf der anderen Seite bildet die Grundlage der Regulation der Transkriptionselongation. Trotz der hohen Abundanz von 7SK RNA in der Zelle, assoziiert *in vivo* jedoch nur ein relativ kleiner Teil hiervon mit P-TEFb, sodass die effektiv zur Verfügung stehende RNA-Menge für die Bildung des 7SK RNP vermutlich limitierend wirkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher neue 7SK RNA interagierende Faktoren zu identifizieren, welche die Interaktion von P-TEFb mit dem 7SK RNP steuern und so die PolII abhängige Transkription regulieren. Anhand verschiedener chromatographischer Reinigungen konnte zunächst ein bislang uncharakterisiertes La ähnliches Protein (LARP7) mit einer spezifischen Affinität für Pyrimidinreiche RNAs isoliert werden. LARP7 bindet, wie durch immunbiochemische Analysen und RNA-Bindungsstudien gezeigt werden konnte, quantitativ an das hoch konservierte uridylreiche 3'-Ende von 7SK RNA. Diese Assoziation erfordert dessen La- und RRM-Domänen und erhöht wesentlich die Stabilität der RNA. Darüber hinaus kofraktioniert LARP7 mit weiteren Faktoren des 7SK RNP, bindet direkt an HEXIM1 und P-TEFb und stellt somit ebenfalls eine integrale Komponente des 7SK RNP dar. Die gewonnenen Daten weisen außerdem erstmals darauf hin, dass P-TEFb durch einen vorgeformten

trimeren Komplexes, bestehend aus HEXIM1, 7SK RNA und LARP7 inhibiert wird. Reporteranalysen in TZMbl-Zellen, welche Luziferase unter der Kontrolle des streng P-TEFb abhängigen HIV-1-LTR-Promotors exprimieren zeigten, dass diese Inhibition im Wesentlichen durch LARP7 vermittelt wird. So ließ sich nach Reduktion der LARP7 Expression mittels RNAi eine signifikante Steigerung der Transkription vom HIV-1-LTR-Promotor beobachten. Eine ähnliche Stimulation der Transkription von PolII konnte in LARP7 defizienten HeLa-Zellen durch quantitative Real-Time-PCR auch für eine Reihe zellulärer Gene nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass LARP7 die generelle PolII Transkription reprimiert, korreliert zudem mit einer bereits beschriebenen Tumorsupressorfunktion des LARP7 homologen mxc Proteins aus *D. melanogaster*. Somit beeinflusst LARP7 das zelluläre Gleichgewicht zwischen freiem und 7SK RNP-gebundenem P-TEFb und fungiert somit als negativer Regulator der PolII Transkription *in vivo*.

## **Summary**

Eucaryotic gene expression is a multistep process, which is critically regulated on the level of RNA polII transcription by the positive transcription elongation factor P-TEFb. P-TEFb forms a heterodimeric complex, consisting of the cyclin-dependent kinase 9 and its cofactor cyclin T1/2. This complex stimulates transcriptional elongation as well as the cotranscriptional processing of the synthesized pre-mRNA by phosphorylation of negative elongation factors and the RNA polII C-terminal domain. To accommodate different growth conditions, P-TEFb activity is kept under tight control through its reversible interaction with 7SK RNA and HEXIM proteins in a catalytically inactive ribonucleoprotein particle (RNP). This sensitive balance between P-TEFb on the one hand and the 7SK RNP on the other represents the basis of transcriptional regulation of elongation. Despite the high abundance of 7SK RNA in the cell, only a small part is associated with P-TEFb *in vivo*, suggesting that the actual amount of RNA available limits the formation of the 7SK RNP.

Hence, the objective of the present study was to identify novel 7SK RNA interacting factors, which direct the interaction of P-TEFb with the 7SK RNP, thereby regulating polII dependent transcription. At first, using different chromatographic purification strategies, an as yet uncharacterized La related protein (LARP7) with an affinity to pyrimidine- rich RNAs was isolated. Immunobiochemical analysis and RNA binding studies revealed, that LARP7 quantitatively associates with the highly conserved 3'-UUU-OH terminus of 7SK RNA. This binding requires its La- and RRM-domain and dramatically increases RNA stability. Moreover, LARP7 co-fractionates with additional factors of the 7SK RNP, binds directly to HEXIM1 and P-TEFb and therefore likewise constitutes an integral component of the 7SK RNP. Data presented here indicate that P-TEFb is inhibited upon association with a trimeric complex consisting of HEXIM1, 7SK RNA and LARP7. Furthermore, reporter gene analysis in TZMbl cells - cells expressing luciferase under the control of the strictly P-TEFb dependent HIV-1-LTR promoter - demonstrated this inhibition to be mainly mediated by LARP7. Thus, reduction of LARP7 expression by RNA-interference led to

## Summary

---

a significant stimulation of transcription in TZMbl cells. In addition, quantitative real time pcr revealed a similar effect on transcription for a series of cellular genes in LARP7 deficient HeLa cells. Moreover, the observation, that LARP7 represses polII transcription in general correlates well with a known function of the *d. melanogaster* LARP7 homologue mxc as a tumor suppressor. Thus, LARP7 affects the cellular P-TEFb/7SK RNP equilibrium und serves as a negative regulator of polII transcription *in vivo*.

## 2 Einleitung

Das erstmals 1958 von Francis Crick aufgestellte Postulat - vom Gen zur RNA zum Protein - beschreibt den Fluss der genetischen Information ausgehend von reiner Speicherung in Form der DNA hin zu den Bausteinen des Lebens (Crick 1958). Eine fein abgestimmte Regulation dieser Prozesse bildet dabei die Grundlage der differentiellen Genexpression und damit der Zelltyp-Spezifität in vielzelligen Organismen. Genexpression und -regulation erfolgt in allen drei Domänen des Lebens mittels einer komplexen molekularen Maschinerie, in deren Mittelpunkt die DNA abhängige RNA Polymerase steht (Borukhov and Nudler 2008). Im Gegensatz zu Bakterien und Archaeen mit jeweils nur einer, universellen, RNA Polymerase, werden in Eukaryoten fünf funktionell und strukturell ähnliche Subtypen PolI – PolV unterschieden. Interessanterweise finden sich die beiden nicht essentiellen RNA Polymerasen PolIV und PolV ausschließlich in höheren Pflanzen, in denen sie an der Biogenese kleiner inhibitorischer RNAs (siRNAs) beteiligt sind, wohingegen PolI, PolII und PolIII ubiquitär exprimiert werden (Pikaard, Haag et al. 2008; Wierzbicki, Haag et al. 2008). Während PolI ribosomale (rRNA) und PolIII transfer RNAs (tRNA) und einige weitere, nicht-kodierende RNAs synthetisiert, werden alle Protein-kodierenden Gene von PolII transkribiert. Vor dem Hintergrund, dass mehrere hundert Faktoren über Zugang, Bindung und Transkription eines einzigen PolII Klasse Gens entscheiden, erscheint eine präzise Kontrolle der Transkription für Wachstum und Entwicklung eines Organismus essentiell (Naar, Lemon et al. 2001; Saunders, Core et al. 2006).

### 2.1 Die eukaryotische PolII Transkription - von der Initiation zur Elongation

Die Transkription Protein-kodierender Gene in Eukaryoten ist ein aus mehreren Stufen bestehender Prozess, an welchem eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beteiligt sind. In dessen Zentrum steht ein über 500 kDa schwerer und aus zwölf Untereinheiten (Rpb1-Rpb12) bestehender Enzymkomplex, die RNA PolII (Cramer, Bushnell et al.

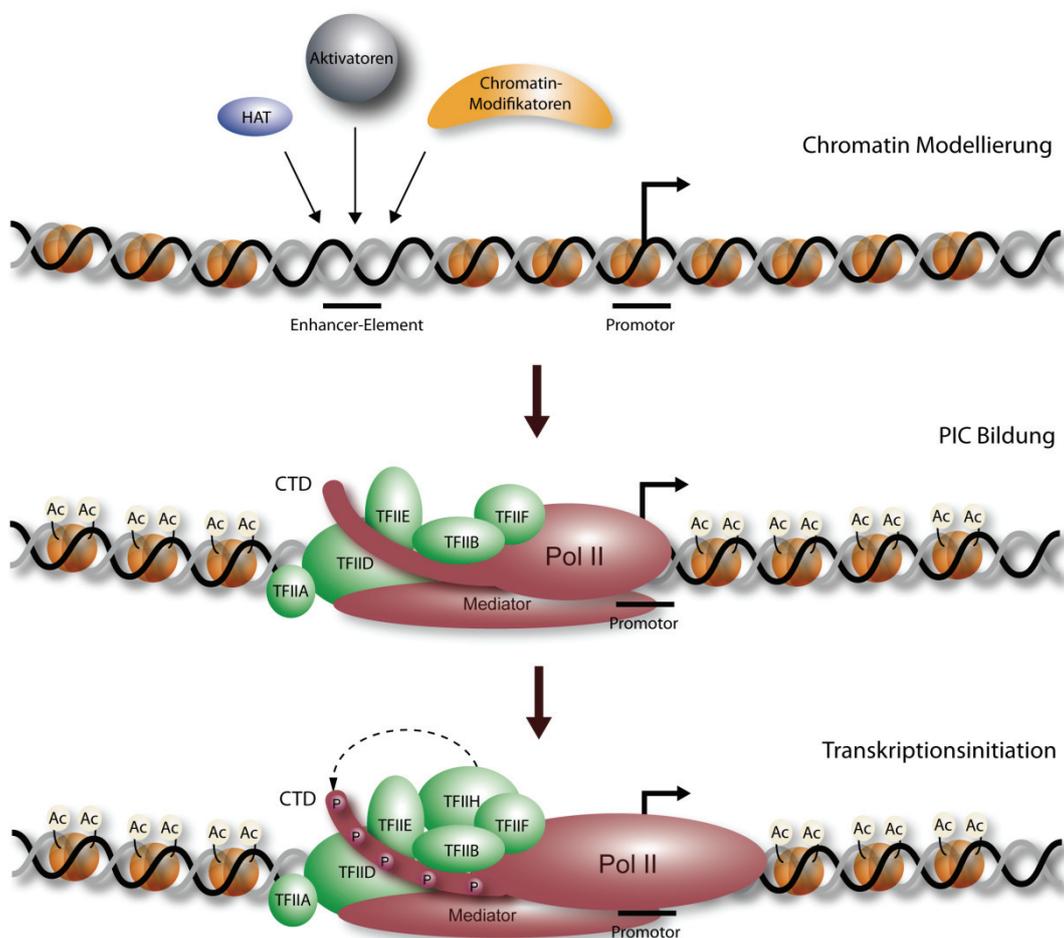
2001). Eine auffällige Besonderheit, welche PolII von allen anderen eukaryotischen RNA Polymerasen abgrenzt, ist eine verlängerte Carboxy-terminale Domäne (CTD) ihrer größten Untereinheit (Rpb1). Diese in Eukaryoten hoch konservierte CTD setzt sich aus Heptapeptid-Wiederholungen der Sequenz YSPTSPS zusammen, deren Anzahl bei verschiedenen Spezies zwischen 52 für die humane CTD und 27 bei *S. cerevisiae* variiert (Prelich 2002). Innerhalb des Transkriptionszyklus unterliegt die CTD zahlreichen Modifikationen, welche ihre Konformation und Assoziation mit spezifischen Transkriptionsfaktoren modulieren (Meinhart, Kamenski et al. 2005). So fungiert sie als Bindungs-Plattform für eine Reihe von Komplexen, die an der Prozessierung der RNA beteiligt sind und während unterschiedlicher Transkriptionsphasen an den RNA PolII-Komplex rekrutiert werden (McCracken, Fong et al. 1997; Komarnitsky, Cho et al. 2000; Proudfoot, Furger et al. 2002). Dementsprechend ließ sich eine vom Phosphorylierungsstatus der CTD abhängige Interaktion von PolII mit 5' *capping* Enzymen, Speißfaktoren und dem *cleavage polyadenylation factor* (CSPF) nachweisen, was eine funktionale Koppelung der Transkription und RNA Prozessierung nahelegt (McCracken, Fong et al. 1997; Bird, Zorio et al. 2004; Zorio and Bentley 2004).

Jede der drei Hauptphasen der Transkription – Promotorbindung/Initiation, Elongation und Termination – ist durch ein typisches CTD Phosphorylierungsmuster charakterisiert. Zu Beginn der Transkription wird nur hypophosphorylierte PolII (PolIIA) an die Initiationsstelle der Transkription, den Promotor, rekrutiert. Der anschließende Wechsel der PolIIA in die hyperphosphorylierte (PolIIO) Form bestimmt den Übergang von Initiation zu produktiver Elongation (Sims, Belotserkovskaya et al. 2004). Gegen Ende des Transkriptionszyklus wird PolIIO durch die TFIIF abhängige CTD Phosphatase (FCP1) wieder in PolIIA überführt und ermöglicht dieser so eine Reinitiation der Transkription am Promotor (Lin, Marshall et al. 2002; Prelich 2002; Meinhart, Kamenski et al. 2005).

### **2.1.1 Die Initiation der Transkription**

Die Struktur des Chromatins aus Nukleosomen, eine sequentielle Abfolge von Histonoktamereinheiten mit je ca. 200 DNA Basenpaaren,

stellt ein wesentliches Hindernis der Transkription dar und blockiert sowohl die Bindung als auch die katalytische Aktivität von PolII (Kornberg and Thomas 1974; Knezetic and Luse 1986). Noch vor der eigentlichen Initiation der Transkription kommt es daher zur Bindung von Transkriptions-Aktivatoren und -Inhibitoren stromaufwärts der Promotorregion (Kadonaga 2004), gefolgt von Histon-Acetyltransferasen und Chromatin-Modifikatoren wie Swi/Snf oder SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) (Howe, Brown et al. 1999; Brown, Lechner et al. 2000; Green 2005).



**Abbildung 1: Modell der Transkriptionsinitiation von RNA PolII.**

Die Bindung von Aktivatoren an Enhancer-Elemente rekrutiert Histon-Acetyltransferasen (HAT) und weitere Chromatin-Modifikatoren an die DNA. Dies führt zu einer Acetylierung von Histonuntereinheiten (Ac) und folglich zu einer Lockerung der Nucleosomenstruktur. Die Mediator gestützte Ausbildung des Präinitiationskomplexes (PIC) aus den Transkriptionsfaktoren TFIID, TFIIB, TFIIF und TFIIE ermöglicht daraufhin die Bindung von RNA PolII am Promotor. TFIIF assoziiert und initiiert durch Ser5 Phosphorylierung der C-terminalen Domäne die Transkription (nach Li, Carey et al. 2007).

Durch die anschließende Modifikation bzw. den Austausch einzelner Histone lockert sich die kompakte Struktur des Chromatins, woraufhin die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) am Promotor ermöglicht wird (Abb. 1) (Saunders, Core et al. 2006; Li, Carey et al. 2007). Die individuelle Anpassung der Nukleosomenzusammensetzung wie auch die Modifikation spezifischer Histonuntereinheiten kontrolliert somit grundsätzlich die Initiation der Transkription und übernimmt eine wesentliche, über die simple Verpackung der DNA hinausgehende, Aufgabe in der Regulation der Genexpression (Narlikar, Fan et al. 2002). Die Position des PIC bestimmt die genaue Startstelle der Transkription. Sie wird mit Hilfe des Mediator Komplexes durch die generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF und TFIIE festgelegt. Der aus 20 Untereinheiten bestehende Mediator Komplex übernimmt dabei die Vermittlung zwischen den Transkriptionsaktivatoren auf der einen und den GTFs bzw. PolIIA auf der anderen Seite (Myers and Kornberg 2000; Hahn 2004; Thomas and Chiang 2006). Anschließend katalysiert die XPB Helikaseuntereinheit von TFIIF ein Entwinden der DNA von ca. 11-15 Basenpaaren, woraus eine Interaktion des aktiven Zentrums der Polymerase mit der einzelsträngigen Matrize resultiert (Wang, Carey et al. 1992; Cramer 2004). PolII beginnt daraufhin mit der Synthese der RNA. Unmittelbar nach der Initiation phosphoryliert der TFIIF assoziierte Cyclin abhängige Kinase 7 (Cdk7)/Cyclin H Subkomplex Ser5 der CTD von PolII. Diese Phosphorylierung ist entscheidend für den nächsten Schritt der Transkription, den Eintritt der Polymerase in die frühe Elongation (Orphanides, Lagrange et al. 1996; Svejstrup, Vichi et al. 1996).

### ***2.1.2 Die Elongation - Promoter escape und promoter proximal pausing***

Mit dem Verlassen der Promotorregion und der partiellen Auflösung des PIC tritt die Polymerase in die frühe Elongationsphase ein. Dieses auch als *promoter escape* bezeichnete Stadium konvertiert den Transkriptionskomplex in den initial transkribierenden Komplex (ITC), welcher sich durch eine hohe Abbruchrate der Transkription auszeichnet (Dvir 2002). Sobald das RNA-Transkript eine Länge von

ca. neun Nukleotiden erreicht, nimmt die Stabilität des Transkriptionskomplexes deutlich zu und das RNA/DNA Hybrid beginnt sich zu trennen (Westover, Bushnell et al. 2004; Hieb, Baran et al. 2006). Die wachsende RNA Kette interagiert daraufhin mit der RNA Polymerase Untereinheit 7 (RPB7) an der Basis der CTD und begründet dadurch den frühen Elongationskomplex (EEC) (Ujvari and Luse 2006). Der EEC unterscheidet sich von einem reifen Elongationskomplex durch zahlreiche kurze Transkriptionspausen bzw. temporäre Verschiebungen des aktiven PolII Zentrums relativ zu dem 3'Ende der RNA (*backtracking*). Schließlich kommt PolII zwischen Position +20 und +40 ganz zum Stillstand (Raschke, Albert et al. 1999; Pal and Luse 2003; Saunders, Core et al. 2006). Dieses erstmals in *D. melanogaster* am Gen für das Hiteschockprotein70 (Hsp70) beschriebene Phänomen des promotornahen transkriptionellen Stillstandes (*promoter proximal pausing*) wurde ebenfalls bei einer großen Anzahl induzierbarer Gene, Haushaltsgene und auch bei viraler Transkription beobachtet (Rougvie and Lis 1988; Rougvie and Lis 1990; Barboric and Peterlin 2005). Folglich bestimmt *in vivo* nicht allein die Bildung des PIC oder die Regulation der Initiation, sondern vielmehr ein kontrollierter Übergang von *promotor proximal pausing* zu effektiver Elongation den Grad der Transkription (Lis 1998).

Bedeutende Fortschritte für das Verständnis dieses Prozesses konnten durch den Einsatz des Nukleotidanalogs und Kinaseinhibitors 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) gewonnen werden. DRB Behandlung führt zu einer massiven Abnahme der zellulären Boten-RNA (mRNA), zur Entstehung kurzer gecappter Transkripte und wirkt in höheren Dosen letal (Sehgal, Darnell et al. 1976). Während DRB die Transkriptionselongation in *D. melanogaster* Zellextrakten nahezu vollständig hemmt, bleibt es bei Verwendung gereinigter RNA PolII jedoch ohne Wirkung (Zandomeni, Mittleman et al. 1982; Chodosh, Fire et al. 1989; Kephart, Marshall et al. 1992). Basierend auf diesen Daten konnten mittels Affinitäts-chromatographie zunächst zwei negative Transkriptionselongationsfaktoren (N-TEF) identifiziert werden, die mit der pausierenden PolII kolokalisieren und diese kooperativ blockieren (Palangat, Renner et al. 2005). Obwohl weder der DRB Sensitivität induzierende Faktor (DSIF) noch der Negative



## 2.2 Der positive Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb

Die tatsächliche Existenz und Identität eines positiven Transkriptionselongationsfaktors konnte durch fraktionierende Reinigung von *D. melanogaster* Kernextrakten bestätigt und auf drei Faktoren, P-TEFa, Faktor 2 und P-TEFb eingegrenzt werden. Während P-TEFa und Faktor 2 rein stimulatorisch wirken, ist die Aktivität von P-TEFb für die Bildung DRB sensibler Transkripte unersetzlich (Marshall and Price 1995). Sequenzanalysen der kleineren der beiden P-TEFb Untereinheiten aus *Drosophila* zeigten Ähnlichkeiten zu der bereits bekannten, jedoch nicht näher charakterisierten humanen Cyclin abhängigen Kinase PITALRE (Grana, De Luca et al. 1994). Außerdem kodiert der N-Terminus der großen Untereinheit ein Cyclin-Motiv und nur die gemeinsame Expression beider Untereinheiten vermag natives P-TEFb in *in vitro* Transkriptionsreaktionen zu ersetzen (Zhu, Pe'ery et al. 1997; Peng, Marshall et al. 1998).

P-TEFb Untereinheiten

Quelle und Untereinheit	Größe (kDa)	Spezies (Referenz)
Insekten		
Cdk9	47	D (Zhu, Pe'ery et al. 1997)
Cyclin T	118	D (Peng, Marshall et al. 1998)
Cyclin K	65	D (Edwards, Wong et al. 1998)
Säuger		
Cdk9	43	H (Grana, De Luca et al. 1994 Zhu, Pe'ery et al. 1997)
Cdk9	55	H (Shore, Byers et al. 2003)
Cyclin T1	81	H (Peng, Zhu et al. 1998 Wei, Garber et al. 1998) M (Garber, Wei et al. 1998)
Cyclin T2a	74	H (Peng, Zhu et al. 1998)
Cyclin T2b	81	H (Peng, Zhu et al. 1998)
Cyclin K	41	H (Fu, Peng et al. 1999 Edwards, Wong et al. 1998) M (Edwards, Wong et al. 1998)

### Abbildung 3: Untereinheiten und Isoformen von P-TEFb

aus *Drosophila melanogaster* (D), Mensch (H) und Maus (M).

Dies lieferte weitere Hinweise für die Hypothese, dass es sich bei P-TEFb um ein Cyclin/Kinase Paar handelte, welches infolgedessen Cyclin

abhängige Kinase 9 (Cdk9) bzw. Cyclin T (CycT), T für Transkription, benannt wurde (Zhu, Pe'ery et al. 1997; Peng, Marshall et al. 1998). Letztendliche Bestätigung erfuhr P-TEFb durch den Nachweis, dass DRB selektiv die Kinaseaktivität von Cdk9 inhibiert und so den Eintritt in die Elongationsphase verhindert (Yamaguchi, Inukai et al. 2002). Anhand der CycT cDNA aus *D. melanogaster* konnten daraufhin im humanen System drei Cdk9 assoziierte Cycline beschrieben werden. Neben der Hauptform CycT1 werden in vielen Zelltypen in geringerem Umfang noch CycT2a und dessen Spleißvariante CycT2b wie auch Cyclin K exprimiert (Edwards, Wong et al. 1998; Peng, Zhu et al. 1998; Fu, Peng et al. 1999). Ferner findet sich zusätzlich zu dem ubiquitär exprimierten 42 kDa großen Cdk9 eine weitere 55 kDa große Isoform, welche von einem zweiten, oberhalb des Transkriptionsstarts der 42 kDa Form liegenden Promotor, gebildet wird (Abb. 3) (Shore, Byers et al. 2003). Da jede Cdk9 Isoform mit allen T bzw. K Cyclinen einen funktionellen P-TEFb bildet, ergeben sich im Menschen somit acht potentiell unterschiedliche Komplexe.

### **2.2.1 P-TEFb reguliert die Transkription der Mehrzahl aller mRNAs**

Obwohl sich Anzeichen häufen, dass einige Promotoren nur spezifische P-TEFb Komplexe rekrutieren, sind insgesamt nur wenige PolII Gene bekannt, die P-TEFb nicht als essentiellen Transkriptionselongationsfaktor benötigen (Medlin, Scurry et al. 2005; Gomes, Bjerke et al. 2006). Beispielsweise reduziert die Behandlung von HeLa Zellen mit dem CDK Inhibitor Flavopyridol oder dem Cdk9 spezifischen Kinaseinhibitor DRB die Transkription aller PolII Gene um ca. 80 % (Chao and Price 2001). Analog dazu führen RNA Interferenz (RNAi) oder Mutagenesen der Kinasedomäne von Cdk9 zu einer verringerten Transkriptionsrate und zu Defekten in der Expression der frühen embryonalen Gene von *C. elegans* (Shim, Walker et al. 2002). Folglich beruht die Funktion von P-TEFb wesentlich auf der Kinaseaktivität der Cdk9 Untereinheit, welche im Verlauf der Elongation eine Reihe von Schlüsselsubstraten phosphoryliert. Zu diesen zählen NELF-E, die Spt5 Untereinheit von DSIF und Ser2 der PolII CTD (Marshall, Peng et al. 1996; Ivanov, Kwak et al. 2000; Zhou, Halanski et al. 2000; Fujinaga, Irwin et al. 2004). Unmittelbar nach Phosphorylierung von NELF verlässt dieser den Transkriptionskomplex. Parallel dazu wird DSIF an

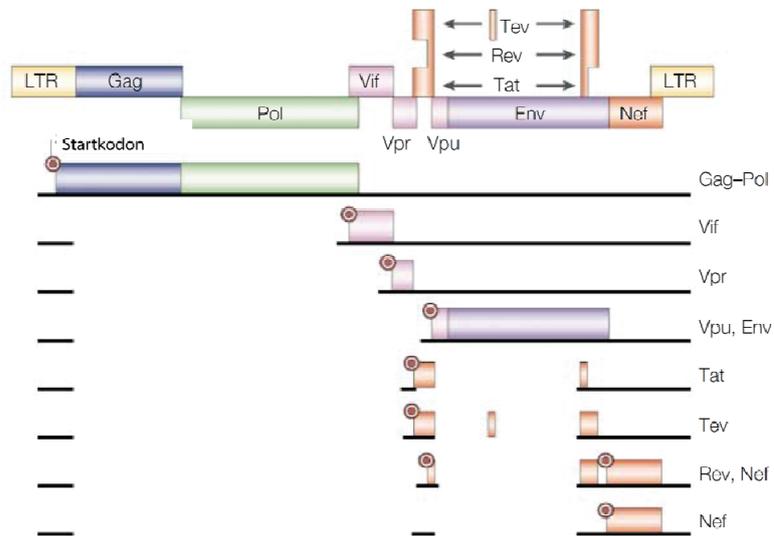
Thr4 Resten eines konservierten repetitiven Motivs im C-Terminus von Spt5 phosphoryliert und konvertiert daraufhin von einem negativen in einen positiven Transkriptionselongationsfaktor (Kim and Sharp 2001; Renner, Yamaguchi et al. 2001; Yamada, Yamaguchi et al. 2006). Beide Ereignisse, zusammen mit der Hyperphosphorylierung der CTD, ermöglichen daraufhin der Polymerase den Eintritt in die produktive Phase der Elongation. Bemerkenswerterweise konnte durch Depletion von Cdk9 in *Drosophila* wie auch in *S. cerevisiae* eine von der Elongation unabhängige Verknüpfung der Ser2 CTD Phosphorylierung mit der 3'-RNA Prozessierung nachgewiesen werden (Ahn, Kim et al. 2004; Ni, Schwartz et al. 2004; Adamson, Shutt et al. 2005). Dementsprechend werden einige Gene, wie Histon H2b oder die U2 snRNA, auch in Abwesenheit von P-TEFb vollständig transkribiert, weisen dann allerdings 3'-Prozessierungsfehler auf (Medlin, Scurry et al. 2005). Infolgedessen übernimmt P-TEFb ebenfalls eine Funktion als 3'-RNA prozessierender Faktor, wobei diese jedoch prinzipiell von dessen Rolle in der Kontrolle der Transkriptionselongation von PolII getrennt zu sein scheint (Zhou and Yik 2006).

### **2.2.2 HIV-1 nutzt P-TEFb als wirtseigenen Kofaktor der Transkription**

Obwohl P-TEFb als genereller Elongationsfaktor der Transkription von PolII fungiert, ist dieser für die Expression einiger Gene unter bestimmten Bedingungen limitierend (Zhou and Yik 2006). Tatsächlich reagieren keine zellulären oder viralen Gene sensitiver auf dessen Verfügbarkeit als die des humanen Immunschwäche Virus (HIV), welches wirtseigenes P-TEFb mit Hilfe einer besonderen Strategie an den Ort seiner Transkription rekrutiert (Yang, Gold et al. 1997; Peterlin and Trono 2003).

Das menschliche Retrovirus HIV gehört zur Gruppe der Lentiviren (Tang, Kuhen et al. 1999). Sein etwa 10 kB großes und für 16 Proteine kodierendes Genom umfasst neben den lentiviralen *gag*, *pol* und *env* Genen, welche klassische strukturelle und enzymatische Faktoren kodieren, noch vier akzessorische (*nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*) und die beiden regulatorischen Gene *rev* und *tat* (Frankel and Young 1998). Nach Aufnahme des Virus in die Zelle und reverser Transkription der

(-) RNA wird die provirale DNA über flankierende Sequenzwiederholungen (*long terminal repeat*, LTR) an deren 5' und 3' Ende in das wirtseigene Genom integriert und verhält sich ab diesem Zeitpunkt in vielen Belangen wie ein zelluläres Gen (Abb. 4).

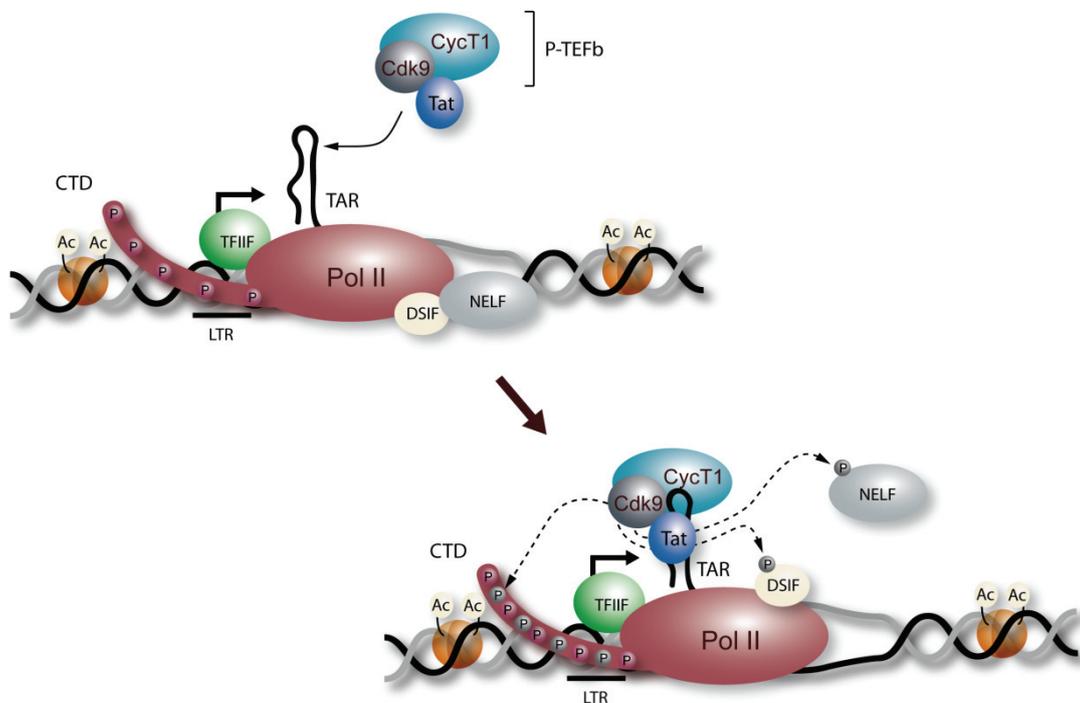


**Abbildung 4: Transkripte des HI-Virus.**

Das über die beiden LTR integrierte 10 kB große Virusgenom kodiert 16 unterschiedliche Proteine, die von wenigstens zehn mRNAs synthetisiert werden. Die kodierenden Sequenzen mit den jeweiligen Startkodons sind über den zugehörigen gespleissten bzw. ungespleissten Transkripten (schwarze Linie) dargestellt (Peterlin and Trono 2003).

Die virale LTR enthält sowohl eine Reihe von Enhancern, welche als Bindungsstellen für die Aktivatoren NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) oder NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) dienen, als auch den Promotor für alle viralen Gene. In der asymptomatisch verlaufenden, proviralen Latenzphase generiert PolII nur kurze nicht polyadenylierte HIV-Transkripte (Kao, Calman et al. 1987). Grund hierfür ist die bei Transkriptionsbeginn aus 59 Nukleotiden gebildete Stamm-Schleife-Struktur der *transactivation response* (TAR) RNA von HIV, welche effizient NTEF rekrutiert und so die weitere Elongation blockiert (Fujinaga, Irwin et al. 2004). HIV löst dieses Problem der zellulären Transkriptionsinaktivierung in aktivierten T-Zellen durch Expression des multifunktionalen Transaktivators (Tat). Tat, dessen initiale Expression durch den wirtseigenen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B stimuliert wird, bindet über ein Arginin-reiches Motiv an TAR und aktiviert unter Zuhilfenahme eines zellulären Kofaktors die Elongation

(Jones and Peterlin 1994; Cullen 1995; Jones 1997; Taube, Fujinaga et al. 1999). *In vitro* Kinaseexperimente wiesen dabei auf eine DRB sensitive, PolII CTD phosphorylierende Kinase als potentiellen Kandidaten, welche als Cdk9 identifiziert werden konnte (Herrmann and Rice 1993; Herrmann and Rice 1995; Marshall, Peng et al. 1996; Yang, Gold et al. 1997; Zhu, Pe'ery et al. 1997). Infolgedessen ergab sich ein Modell der P-TEFb vermittelten Transkription von HIV. Tat bindet in HIV infizierten Zellen an Cyc T1/Cdk9 und bildet zusammen mit TAR einen ternären Komplex, welcher daraufhin die Transkription durch Phosphorylierung der NTEF und PolII CTD stimuliert (Abb. 5) (Garber, Wei et al. 1998; Garriga, Peng et al. 1998; Wei, Garber et al. 1998; Ivanov, Kwak et al. 1999; Kim, Bourgeois et al. 2002).



**Abbildung 5: Mechanismus der Tat Transaktivierung.**

Die Initiation der Transkription von HIV beginnt an der LTR und wird, analog zur zellulären Transkription, durch NELF und DSIF blockiert. P-TEFb assoziiert mit der viralen Transkriptionsaktivator Tat und bildet infolgedessen mit der exponierten TAR RNA einen ternären Komplex. Die spezifische Rekrutierung von P-TEFb an den HIV Transkriptionskomplex durch Tat ermöglicht anschließend die Phosphorylierung der beiden NTEF und der CTD.

Von vier potentiell P-TEFb assoziierten Cyclinen interagiert nur Cyc T1 mit Tat. Ein für diese Interaktion essentielles Cystein an Position 261 von Cyc T1 findet sich nur in Primaten, nicht aber in anderen Säugern.

Dies ist einer der wesentlichen Gründe der Spezies Spezifität von HIV (Bieniasz, Grdina et al. 1998; Garber, Wei et al. 1998; Napolitano, Licciardo et al. 1999; Wimmer, Fujinaga et al. 1999).

Die Aktivität des ternären Komplexes und damit die Effizienz der HIV-1 Transkription wird überdies durch weitere Faktoren, wie das c-Ski interagierende Protein (SKIP), eine essentielle Komponente des Spleißosoms, moduliert (Neubauer, King et al. 1998; Bres, Gomes et al. 2005). Ebenso stimuliert Tat-SF1, ein nukleäres Protein welches an den C-Terminus von Cyc T1 bindet, die HIV spezifische wie auch die zelluläre Transkriptionselongation. Darüberhinaus rekrutiert Tat-SF1 die spleißosomale Maschinerie an die elongierende PolII, wodurch das Spleißen der RNA gefördert wird. (Zhou and Sharp 1996; Kim, Yamaguchi et al. 1999; Parada and Roeder 1999). Diese, P-TEFb abhängige, duale Funktion von Tat-SF1 erlaubt daher eine effiziente Kopplung der Transkriptionselongation mit einem weiteren Schritt der RNA Prozessierung, dem Spleißen.

### **2.3 Die Regulation der zellulären P-TEFb Aktivität**

Die Aktivität Zellzyklus-regulierender Cdks wird bekanntermaßen durch Kinaseinhibitoren (CKI) sowie durch die kontrollierte Expression und Dagradaion der assoziierten Cycline präzise gesteuert. Als Mitglied der Cdk Familie sollte Cdk9 und damit P-TEFb somit ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Eine Analyse der Expression der Untereinheiten von P-TEFb ließ erkennen, dass diese ubiquitär exprimiert werden, wobei zum Teil jedoch sehr unterschiedliche Muster und Expressionsgrade erkennbar sind (Grana, De Luca et al. 1994; Peng, Zhu et al. 1998). Beispielsweise steigt in aktivierten T-Zellen die Konzentration von Cyc T1 parallel zur PolII CTD Hyperphosphorylierung und stimuliert damit die Transkription von HIV (Garriga, Peng et al. 1998). Obwohl auch das Expressionsniveau von Cdk9 gravierende Unterschiede aufweist und einzelne Isoformen in verschiedenen Zelltypen variieren, konnten bislang noch keine genaueren Daten über die Spezifität und Regulation der jeweiligen P-TEFb Komplexe gewonnen werden (Grana, De Luca et al. 1994). Zusätzlich verändern posttranslationale Modifikationen von Cdk9 bzw. Cyc T1 deren Aktivität. Ubiquitinierung von Cyc T1 durch Skp2

beeinflusst sowohl die Degradation von P-TEFb wie auch dessen Interaktion mit Tat und TAR (Kiernan, Emiliani et al. 2001; Barboric, Zhang et al. 2005). Ebenso entscheidet die Phosphorylierung eines in allen Cyclin abhängigen Kinasen hoch konservierten Thr 186 in der T-Schleife von Cdk9 wie auch die Azetylierung eines Lysinrestes an Position 44 über dessen Aktivität (Chen, Yang et al. 2004; Li, Price et al. 2005; Fu, Yoon et al. 2007). Nichtsdestoweniger binden weder Cdk9 noch Cyc T1 sequenzspezifisch an DNA oder RNA, weshalb sich die Frage nach der Rekrutierung von P-TEFb an den Transkriptionskomplex stellt. Die Transkription von HIV bedient sich dazu des viralen RNA-Enhancers Tat, welcher zusammen mit P-TEFb und TAR den ternären Komplex bildet (Garber, Wei et al. 1998; Peterlin and Trono 2003). Außer mit Tat, assoziiert P-TEFb mit einigen zellulären Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, c-Myc, CIITA u.a. und stimuliert so die Transkription spezifischer Gene (Kanazawa, Okamoto et al. 2000; Barboric, Nissen et al. 2001; Kanazawa, Soucek et al. 2003). Angesichts dessen, dass die Elongation von mehr als drei Viertel aller PolII Gene durch P-TEFb kontrolliert wird, liegt jedoch das Vorhandensein eines generellen Rekrutierungsmechanismus nahe (Chao and Price 2001).

### **2.3.1 Die positive Regulation von P-TEFb durch Brd4**

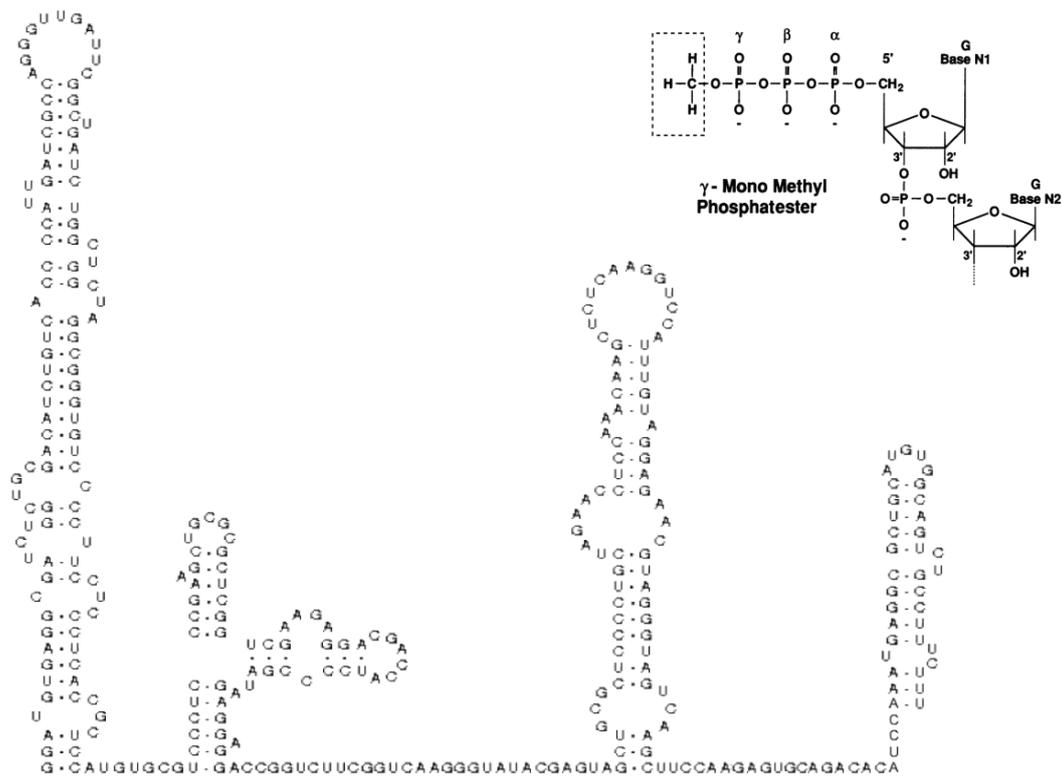
P-TEFb muss, um die Elongation durch PolII stimulieren zu können, direkt an die Transkriptionseinheit rekrutiert werden. Daher ergab sich die Frage, welche(r) Faktor(en) eine Interaktion von P-TEFb mit der Transkriptionsmaschinerie vermitteln. Systematische Analyse von HeLa Kernextrakten im Dichtegradienten zeigte, dass ca. 50 % von P-TEFb mit einem 200 kDa großen Kernprotein, dem Bromodomänen-Protein 4 (Brd4), kofraktionieren (Jang, Mochizuki et al. 2005). Brd4 ist Teil der konservierten Familie der BET Proteine, welche sich durch zwei Bromo- und eine ExtraTerminale Domäne auszeichnen (Jeanmougin, Wurtz et al. 1997; Dey, Ellenberg et al. 2000). BET Proteine stehen in Zusammenhang mit Transkriptionsereignissen und binden über ihre Bromodomäne vornehmlich an acetylierte Histone, ein Kennzeichen aktiv transkribierten Chromatins (Zeng and Zhou 2002; Ladurner, Inouye et al. 2003; Matangkasombut and Buratowski 2003; Kanno, Kanno et al. 2004). Damit übereinstimmend konnte eine Bindung von

Brd4 an den Mediator-Komplex und an Histon H3 und H4 nachgewiesen werden (Jiang, Veschambre et al. 1998; Houzelstein, Bullock et al. 2002). Als ein weiteres Indiz einer Brd4 vermittelten Transkriptionsaktivierung, führt die Depletion von Brd4 zu einem Verlust der Bindung von P-TEFb an PolII und dem damit einhergehenden Ende der Transkription (Jang, Mochizuki et al. 2005; Yang, Yik et al. 2005). Ferner konnte mithilfe von Bindungsstudien eine direkte Interaktion der beiden Bromodomänen von Brd4 mit Cyc T1 nachgewiesen werden (Jang, Mochizuki et al. 2005). Obwohl für Cdk9 keine direkte Bindung an Brd4 erkennbar ist, verhindert der Austausch eines einzigen, die Kinaseaktivität nicht beeinflussenden Serins, Ser175, die Bindung von P-TEFb an Brd4. Diese in der flexiblen T-Schleife von Cdk9 liegende Mutation verändert vermutlich die Konformation des Cdk9/Cyc T1 Heterodimers und maskiert so die Brd4 Bindestelle in Cyc T1 (Yang, Yik et al. 2005). Anhand dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass die *in vivo* und *in vitro* aktive Form von P-TEFb an Brd4 gebunden vorliegt.

Zusätzlich könnten weitere, spezifische, Faktoren die Effizienz der Transkriptionselongation noch steigern. NF- $\kappa$ B bindet beispielsweise im Anfangsstadium der HIV Transkription an zwei LTR interne *Enhancer* und rekrutiert neben P-TEFb die Histonazetylase p300. Die anschließende Azetylierung von Histonen ermöglicht eine zusätzliche Stimulation der Elongation durch Brd4/P-TEFb über die basale Ebene hinaus und erlaubt somit die Expression von Tat (Zhong, May et al. 2002; Zhou and Yik 2006). BRD4 scheint jedoch nach Rekrutierung von P-TEFb den Transkriptionskomplex wieder zu verlassen, da beide weder über die komplette Transkriptionseinheit hinweg kolokalisieren, noch eine Veränderung der Aktivität von Cdk9 in Abhängigkeit von Brd4 zu beobachten ist (Yang, Yik et al. 2005). Vielmehr ersetzt eine direkte Wechselwirkung der PolII CTD mit dem C-terminus von Cyc T1 Brd4 im weiteren Verlauf der Transkription (Taube, Lin et al. 2002). Während Brd4 am Transkriptionskomplex somit vermutlich nur transient mit Chromatin interagiert, assoziiert es stabil mit mitotischen Chromosomen und überträgt möglicherweise so das jeweilige Transkriptionsmuster auf die Tochterzellen (Dey, Ellenberg et al. 2000; Dey, Chitsaz et al. 2003; Zhou and Yik 2006; Wu and Chiang 2007).

### **2.3.2 7SK RNA, HEXIM1/2 und P-TEFb - das 7SK RNP**

Trotz der universellen Funktion von Brd4 zeigt in proliferierenden HeLa Zellen nur etwa die Hälfte der Cdk9/Cyc T1 Heterodimere Kinaseaktivität, wohingegen die andere Hälfte in einem höher molekularen, Brd4 freien, 12 S Partikel sedimentiert (Nguyen, Kiss et al. 2001; Jang, Mochizuki et al. 2005). Ein Vergleich der CTD-Kinaseaktivität beider Komplexe nach Immunpräzipitation von P-TEFb aus den entsprechenden Fraktionen lieferte eine ca. 15 fach erhöhte Aktivität des kleineren, Brd4 enthaltenden Komplexes (Nguyen, Kiss et al. 2001). Anhand dessen lag die Vermutung nahe, dass ein inhibitorischer Faktor im größeren Komplex die Funktion von P-TEFb hemmen könnte. Außerdem verursachte eine Behandlung mit Hochsalz oder RNase eine Erhöhung der Aktivität und ein Verschwinden des großen zugunsten des kleinen Komplexes. Eine nähere Untersuchung der 12 S Komplex assoziierten RNAs führte daraufhin zu der Identifikation einer kleinen RNA, der 7SK RNA (Nguyen, Kiss et al. 2001; Yang, Zhu et al. 2001). 7SK RNA ist in Vertebraten hoch konserviert und gehört mit  $2 \times 10^5$  Kopien pro Zelle zu den abundantesten nicht kodierenden nukleären RNAs (Wassarman and Steitz 1991). Wie U6 snRNA schützt diese RNA eine besondere  $\gamma$ -Methyl-Capstruktur am 5'-Ende, die wesentlich zu ihrer Stabilität beiträgt (Abb. 6) (Gupta, Busch et al. 1990; Shumyatsky, Tillib et al. 1990; Shumyatsky, Wright et al. 1993). Die Funktion dieser 331 nt langen, PolIII transkribierten RNA blieb jedoch seit ihrer Entdeckung über drei Jahrzehnte unbekannt (Zieve and Penman 1976; Murphy, Di Liegro et al. 1987; Wassarman and Steitz 1991). Eine Rolle von 7SK RNA in der Inhibition der P-TEFb vermittelten Transkriptionselongation von PolII konnte schließlich durch eine Reihe von Beobachtungen bestätigt werden. So entfernt eine quantitative Depletion von 7SK RNA aus HeLa-Zellen 50% von P-TEFb. Dies hat allerdings keine Veränderung der Transkription zur Folge (Yang, Zhu et al. 2001). Im Gegensatz dazu steigt die Transkription unter Stressbedingungen, wie z.B. nach Bestrahlung mit UV-Licht bzw. bei niedriger Dosis des Transkriptionsinhibitors Aktinomyzin D (Act D), unter welchen sich erwiesenermaßen 7SK RNA von Cdk9/Cyc T1 trennt (Valerie, Delers et al. 1988; Casse, Giannoni et al. 1999).

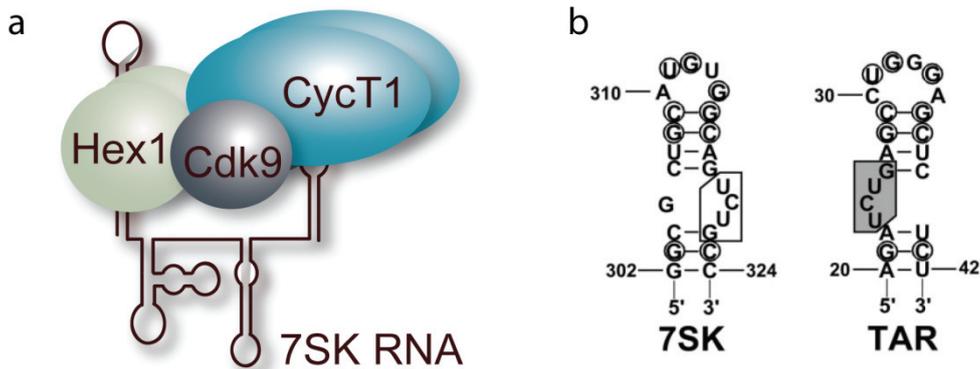


**Abbildung 6: Sequenz und Struktur der humanen 7SK RNA**

basierend auf enzymatischen und chemischen Analysen. Am 5'-Ende trägt die RNA ein seltenes  $\gamma$ -Mono Methyl Phosphat Cap (Gupta, Busch et al. 1990; Wassarman and Steitz 1991).

*In vitro* Rekonstitutionsexperimente mit gereinigter 7SK RNA wiesen auf eine für die Inhibition der Transkription notwendige, jedoch alleine nicht ausreichende Interaktion mit P-TEFb hin (Yik, Chen et al. 2003). 7SK RNA benötigt hierzu die Hilfe eines weiteren Proteins, welches nach massenspektrometrischer Analyse des nativ affinitätsgereinigten Komplexes als das Hexamethylenbisazetamid (HMBA) induzierbare Protein 1 (HEXIM1) identifiziert werden konnte (Sanders, Jennings et al. 2002; Michels, Nguyen et al. 2003; Yik, Chen et al. 2003). Die Chemikalie HMBA führt in vaskulären glatten Muskelzellen, wie auch in vielen anderen Zelltypen, zu einer Erhöhung des HEXIM1 Spiegels, unterdrückt das Zellwachstum und fördert die Zelldifferenzierung (Marks, Richon et al. 1994; Ouchida, Kusuhara et al. 2003; Yik, Chen et al. 2005). Dieser Effekt steht in Einklang mit einer HEXIM1 spezifischen Inhibition der Kinaseaktivität von P-TEFb, welche für gewöhnlich die Proliferation der Zelle stimuliert. HEXIM1 interagiert mit P-TEFb jedoch nur in Abhängigkeit von 7SK RNA. Dementsprechend

führen alle Effekte die 7SK RNA von P-TEFb dissoziieren, wie UV-Stress, Act D oder RNase, ebenfalls zu einer Dissoziation von HEXIM1 (Yik, Chen et al. 2003). Die RNA bildet dabei das Grundgerüst des Komplexes. Wie gezeigt werden konnte ist die Bindung von HEXIM1 an die 5´Stamm-Schleifenstruktur von 7SK RNA Voraussetzung für die Rekrutierung von P-TEFb an die apikale Stamm-Schleife am 3´Ende (Michels, Fraldi et al. 2004; Egloff, Van Herreweghe et al. 2006). Daneben bestimmen weitere kooperative Interaktionen zwischen HEXIM1, 7SK RNA und P-TEFb die Architektur des 7SK RNP. Eine zentrale, basische Domäne in HEXIM1 assoziiert in Abwesenheit von 7SK RNA mit einer an sauren Aminosäuren reichen C-terminal liegenden HEXIM1 Region und verhindert so deren P-TEFb Bindung und Inhibition (Michels, Fraldi et al. 2004; Barboric, Kohoutek et al. 2005). 7SK RNA löst diese intramolekulare Wechselwirkung, indem sie ein zentrales KHRR-Motiv in HEXIM1 bindet und dadurch die C-terminale Domäne für die Interaktion mit P-TEFb freigibt (Abb. 7a) (Barboric, Kohoutek et al. 2005; Egloff, Van Herreweghe et al. 2006). Interessanterweise nutzt das virale Tat Protein ebenfalls eine KHRR ähnliche Domäne, um eine zur 3´Stamm-Schleife der 7SK RNA homologe Sequenz in TAR zu binden (Yik, Chen et al. 2004). Weitere Analogien finden sich auch in der Assoziation von Cyc T1 mit TAR bzw. der 3´Stamm-Schleife von 7SK RNA sowie der Bindung von HEXIM1 bzw. Tat an eine der Cyclin-box benachbarte Region in Cyc T1 (Karn 1999; Michels, Nguyen et al. 2003; Chen, Yang et al. 2004; Egloff, Van Herreweghe et al. 2006; Dames, Schonichen et al. 2007). Diese evolutive Ähnlichkeit der Interaktion von HEXIM1/7SK RNA und Tat/TAR mit P-TEFb lässt einen Mechanismus vermuten, durch den HIV die Effizienz seiner Transkription maximiert (Abb. 7b) (Zhou and Yik 2006). Im Zuge dessen konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden, dass Tat HEXIM1/7SK RNA aus bestehenden 7SK RNPs verdrängt und deren Neubildung verhindert (Schulte, Czudnochowski et al. 2005; Sedore, Byers et al. 2007).



**Abbildung 7: (a) Modell des 7SK RNP und (b) Schematische Darstellung der Analogien von TAR und der 3' Stamm-Schleife von 7SK RNA.**

(a) HEXIM1 bindet an die 5' Stammstruktur der 7SK RNA. Diese Bindung ermöglicht die Interaktion von Cyc T1, sowohl mit dem C-Terminus von HEXIM1 als auch mit der 3'-Schleife von 7SK RNA. (b) Konservierte Nukleotide sind umkreist. Cyc T1 bindet an der apikalen Schleife von 7SK bzw. TAR. Die Tat Bindungsdomäne und die ihr homologe invertierte Sequenz in 7SK RNA sind schattiert und markiert.

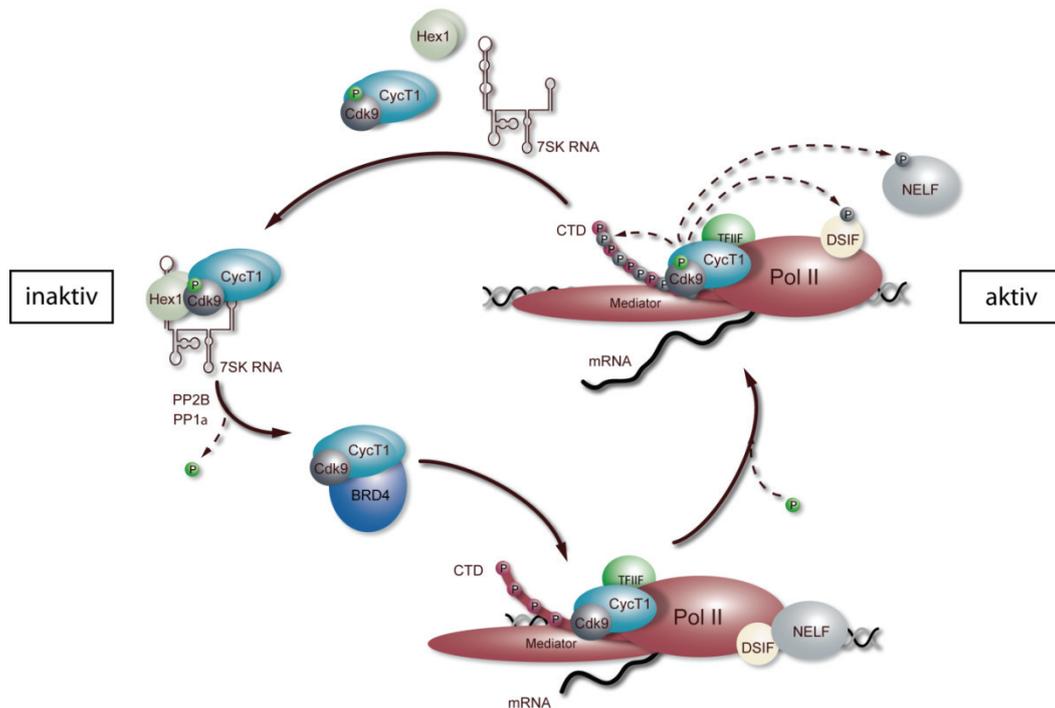
Innerhalb des 7SK RNP liegt HEXIM1 als ein an ein einziges 7SK RNA Molekül gebundenes Dimer vor (Dulac, Michels et al. 2005; Li, Price et al. 2005). Funktionell wie auch strukturell kann HEXIM1 durch das ihm in weiten Teilen homologe, jedoch wesentlich weniger abundante HEXIM2 ersetzt werden (Byers, Price et al. 2005; Yik, Chen et al. 2005). Jedes der HEXIM Monomere rekrutiert nach Bindung an 7SK RNA eines der Cdk9/Cyc T bzw. K Heterodimere (Li, Price et al. 2005). Während die Konsequenzen der damit möglichen unterschiedlichen P-TEFb Kompositionen noch unklar sind, scheinen Bildung und Auflösung des 7SK RNP an sich durch posttranslationale Modifikationen nachhaltig reguliert zu werden.

## 2.4 Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen P-TEFb und 7SK RNP reguliert Zellwachstum und Differenzierung

Die zentrale Stellung von P-TEFb in der Transkription erfordert dessen schnelle und effiziente Regulation infolge sich stetig ändernder physiologischer Bedingungen. Daher beeinflusst sowohl die differentielle Expression der einzelnen 7SK RNP Komponenten, als auch die Balance zwischen P-TEFb und 7SK RNP den Status der Transkription und damit die zelluläre Homöostase (Peterlin and Price 2006; Zhou and Yik 2006). Welche Signalmechanismen und

Modifikationen an der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts beteiligt sind, bleibt zu untersuchen, jedoch entscheidet offensichtlich das Phosphorylierungsmuster von Cdk9 maßgeblich über die Aktivität von P-TEFb. Volle Aktivität erreicht P-TEFb nur nach Phosphorylierung von Cdk9 an einem in allen Cyclin abhängigen Kinasen konservierten Thr 186 (Morgan 1995; Russo, Jeffrey et al. 1996). Diese Phosphorylierung ist jedoch auch Voraussetzung für die Bindung und Inhibition von P-TEFb durch HEXIM1 und 7SK RNA an P-TEFb (Chen, Yang et al. 2004). Trotz dieses augenscheinlichen Paradoxons ermöglicht eine derartige Regulation die umgehende Aufnahme von P-TEFb in das 7SK RNP am Ende der Transkription. In Zusammenhang mit einer Regulation von P-TEFb durch Phosphorylierung von Thr 186 konnte in HeLa Zellen unter Stressbedingungen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der Protein-Phosphatase 2B (PP2B) beobachtet werden. PP2B induziert eine Konformationsänderung innerhalb des 7SK RNP, woraufhin die T-Schleife von Cdk9 für eine weitere Phosphatase, Protein-Phosphatase 1a (PP1a), zugänglich wird (Cheng and Price 2008). Die anschließende Dephosphorylierung von Thr 186 durch PP1a resultiert in einer Freisetzung von HEXIM1/7SK RNA und der Rekrutierung von P-TEFb an den PIC durch Brd4 (Isel and Karn 1999; Ping and Rana 1999; Jang, Mochizuki et al. 2005; Chen, Liu et al. 2008). Am Übergang von Initiation zur Elongation wird Cdk9 durch eine noch unbekannte Kinase wieder aktiviert und stimuliert so die Transkription (Abb. 8) (Chen, Yang et al. 2004).

Obwohl in proliferierenden HeLa Zellen P-TEFb zu annähernd 50 % mit Brd4 und zu 50 % mit HEXIM1/7SK RNA assoziiert vorliegt, variiert dieses Verhältnis in anderen Zelltypen je nach Differenzierungs- bzw. Wachstumsstatus. Beispielsweise enthalten ruhende periphere Blutlymphozyten (PBL) nur wenig P-TEFb und damit einhergehend nur wenig HEXIM1. Nach Aktivierung der Zellen steigt entsprechend der erhöhten Anforderung an die Transkription die Menge an P-TEFb. Parallel dazu steigt die Expression von HEXIM1 bzw. 7SK RNA, und gewährleistet so die sensible Balance zwischen aktivem und 7SK RNA / HEXIM1 gebundenem P-TEFb (Haaland, Herrmann et al. 2003; Haaland, Herrmann et al. 2005). Allerdings wird das Gleichgewicht zwischen P-TEFb und dem 7SK RNP vermutlich nicht ausschließlich durch die absolute Menge von HEXIM1 reguliert.



**Abbildung 8: P-TEFb kontrolliert die Transkriptionselongation von PolII.**

Die Interaktion von HEXIM1/7SK RNA mit P-TEFb phosphoryliert an Cdk9 Thr 186 führt zur Bildung des inaktiven 7SK RNP. Kooperative Dephosphorylierung von Thr 186 durch die beiden Phosphatasen PP2B und PP1a reaktiviert P-TEFb bei erhöhtem Transkriptionsbedarf und ermöglicht so die Rekrutierung an den Transkriptionskomplex über Brd4. P-TEFb erlangt volle Kinaseaktivität jedoch erst nach erneuter Phosphorylierung von Thr 186 durch eine noch unbekannte Kinase. Nach Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) von PolII und der beiden NTEF, DSIF und NELF wird P-TEFb am Ende des Transkriptionszyklus freigesetzt und interagiert direkt mit HEXIM1/7SK RNA.

In Jurkat Zellen sind beispielsweise ca. 30 %, in HeLa Zellen sogar 75 % von HEXIM1 nicht an P-TEFb gebunden (Byers, Price et al. 2005). Vielmehr scheint die Verfügbarkeit von 7SK RNA die RNP-Bildung zu limitieren, da deren Überexpression zu einer Inhibition der PolII Transkription führt (Egloff, Van Herreweghe et al. 2006). Dies ist umso erstaunlicher, angesichts der Tatsache, dass trotz des eigentlichen Überschusses an 7SK RNA im Vergleich zu HEXIM1 und P-TEFb nur 30 % der RNA im 7SK RNP fixiert werden (Haaland, Herrmann et al. 2003). Daher scheint die Regulation der 7SK RNA Verfügbarkeit der Schlüssel für die Kontrolle der Aktivität von P-TEFb zu sein.

## 2.5 Problemstellung und Konzeption

7SK RNA übernimmt eine zentrale Stellung innerhalb des 7SK RNP und beeinflusst somit wesentlich die Genexpression in höheren Eukaryoten. Aufgrund der reversiblen Assoziation der 7SK RNA mit HEXIM1 und P-TEFb reguliert insbesondere deren Verfügbarkeit das sensible Gleichgewicht zwischen P-TEFb und dem 7SK RNP. Da 7SK RNA einerseits äußerst abundant ist, andererseits nur partiell in das 7SK RNP inkorporiert wird, verhindert möglicherweise die reversible Bindung anderer Faktoren an 7SK RNA deren Interaktion mit HEXIM1 und P-TEFb (Van Herreweghe, Egloff et al. 2007). Infolgedessen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die dynamische Struktur des 7SK RNP näher untersucht werden.

- In der Annahme, dass weitere Faktoren die Integration der RNA in das RNP beeinflussen, sollten mithilfe einer geeigneten Aufreinigungsstrategie neue 7SK RNA Interaktoren identifiziert werden.
- Potentiell 7SK RNP regulierende Faktoren müssten folglich nach chromatographischer Aufreinigung von Zellextrakten zumindest partiell mit P-TEFb kofraktionieren,
- in direkten Bindungsstudien mit Komponenten des 7SK RNP interagieren und
- unter Stressbedingungen von P-TEFb dissoziieren.
- Weiterhin sollte anhand von Reporterstudien der Frage nachgegangen werden, ob die Reduktion eines möglichen Kandidaten durch gängige Techniken die Transkription zellulärer Gene beeinflusst.
- Dies sollte insbesondere für die Transkription HIV-1 eigener Gene zutreffen und stellt eine essentielle Grundvoraussetzung für die P-TEFb abhängige PolII Transkription dar.



## 3 Material

### 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben in p.A.-Qualität von BD Biosciences (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Radiochemikalien stammten von GE Life Sciences (Freiburg), Restriktionsenzyme und Phosphatasen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main), DNA-Polymerasen von MBI Fermentas und peqlab (Erlangen). Oligonukleotide wurden bei biomers.net (Ulm) oder Metabion (Martinsried) synthetisiert.

#### 3.1.1 *Chromatographische Matrices*

Glutathion-Sepharose	Amersham, Freiburg
Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)	QIAGEN, Hülse
M2-Agarose <i>affinity</i> Matrix	Sigma, München
ProBond Purification System	Invitrogen, Karlsruhe
Protein G-Sepharose	Amersham, Freiburg
CNBr activated Sepharose 4B	Amersham, Freiburg

#### 3.1.2 *Längenstandards*

Precision Plus Protein Unstained Standard	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein All Blue Standard	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad, München
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.1.3 *Reaktions-Sets (Kits)*

Amplify-Lösung	Amersham, Freiburg
Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Desoxynucleotidmix	Roche, Mannheim
Effectene Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden
Nanofectin Transfection Reagent	PAA, Linz (Österreich)
Oligofectamine Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Hi Di Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond AX500, AX2000	Macherey-Nagel, Düren
QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
ThermoABsolute™ QPCR SYBR® Green	ABgene, Hamburg
Ribonucleotidmix	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim

**3.1.4 Dialyse- und Filtermaterial**

Whatman 3MM-Filterpapier	Hartenstein, Würzburg
Dialyseschlauch MWCO 30kD	Roth, Karlsruhe
Rundfilter 11cm	Macherey-Nagel, Düren
MF-Millipore Membranfilter	Sigma, München

**3.1.5 Kunststoffwaren und -gefäße**

DC-Plastikfolien PEI Cellulose F	Merck, Darmstadt
Gewebekulturflasche, steril 50 ml, 25 cm <sup>2</sup> , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflasche, steril 250 ml, 75 cm <sup>2</sup> , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflasche, steril 550 ml, 175 cm <sup>2</sup> , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril 100 mm	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril 145 mm	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Peske, Aindling-Pichl
15 ml und 50 ml PP Test Tubes	Noras, Würzburg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturpipetten, steril 5, 10 und 25 ml	Greiner, Frickenhausen

**3.1.6 Röntgenfilme und Screens**

<i>BioMax TranScreen High Energy (HE)/(LE)</i>	Noras, Würzburg
Röntgenfilme Kodak Biomax MR/MS	Noras, Würzburg

### 3.1.7 *Transfermembranen*

Hybond-P PVDF-Membran	Amersham, Freiburg
Protran Nitrocellulosemembran BA85	PerkinElmer, Rüdgau-Jügesheim

## 3.2 **Lösungen, Puffer und Medien**

### 3.2.1 *Allgemeine Lösungen*

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2 % 10 % (v/v) 3 % (v/v)	Amidoschwarz Methanol Essigsäure
B-Puffer	0.5 M 0.5 M pH 8.3	Ethanolamin NaCl
Blockpuffer	150 mM 50 mM 0,01 % pH 7,5	NaCl Tris/HCl NP40
C-Puffer	0.2 M 0.5 M pH 8.3	NaHCO <sub>3</sub> , NaCl
Coomassie-Färbelösung	50 % (v/v) 10 % (v/v) 0,25 % (w/v)	Methanol Essigsäure SERVA Blue R (SERVA)
Coomassie-Entfärbelösung	30 % 10 % (v/v)	Methanol Essigsäure
ECL I	6,8 mM	p-Cumarsäure in

		DMSO
ECL II	1,25 mM 100 mM pH 8,5	Luminol Tris/HCl
EMSA-Puffer	10 mM 10 mM 2 mM 1 mM 5 % (w/v) 100 µg pH 7,5	HEPES KCl MgCl <sub>2</sub> DTT Glyzerin tRNA
G-Puffer	10 mM 150 mM 1,5 mM 10 mM 1 mM 0,5 mM pH 7,9	HEPES NaCl MgCl <sub>2</sub> KCl DTT EDTA
GST-Aufschlusspuffer	800 mM 50 mM 5 mM 5 mM 0,01 % 1 mM 1 mM 20 mg/l 20 mg/l 0,1 mM pH 7,5	NaCl Tris-HCl EDTA EGTA NP40 DTT PMSF Aprotinin AP Leupeptin/ Pepstatin AEBSF
His-Aufschlusspuffer	300 mM 50 mM	NaCl Natriumphosphat-

## Material

---

		Puffer (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
	0,01 %	NP40
	10 µl/50ml	β-Mercaptoethanol
	1 mM	PMSF
	20 mg/l	Aprotinin
	20 mg/l	Leupeptin/ Pepstatin
	0,1 mM	AEBSF
	10 mM	Imidazolchlorid
	pH 8,0	
IP-Puffer	300 mM	NaCl
	50mM	Tris/HCl
	0,01%	NP40
	5 mM	MgCL <sub>2</sub>
Lysepuffer	50 mM	Tris/HCl
	500 mM	NaCl
	0,5 %	NP40
	20 % (w/v)	Glyzerin
	0,5 mM	PMSF
	5 mM	β-Mercaptoethanol
	pH 7,9	
P1	50 mM	Tris/HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
	pH 8,0	
P2	200 mM	NaOH
	1% (w/v)	SDS
P3	3 M	Kaliumazetat
	pH 5,5	

---

PK-Puffer	150 mM	NaCl
	100 mM	Tris pH 7.0
	12.5 mM	EDTA pH 8.0
	1%	SDS
PBS	130 mM	NaCl
	40 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	20 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4	
Ponceau S-Färbelösung	0,5%	Ponceau
	1% (v/v)	Essigsäure
Rando-Puffer	20 mM	Tris/HOAc
	140 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	1 mM	CaCl <sub>2</sub> ,
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	pH 7.4	mit HOAc
R-220	220 mM	NaCl
R-300	300 mM	NaCl
R-350	350 mM	NaCl
RIPA-Puffer	150 mM	KCl
	50 mM	Tris/HCl
	2 mM	EDTA
	0,5 mM	DTT
	0,1% (v/v)	NP40
	pH 7,4	
RNA-Elutionspuffer	300 mM	NaOAc
	2 mM	EDTA

## Material

---

	0,1 M	SDS
RNA-Polyacrylamid-Gele (denaturierend)	10 %	Polyacrylamid (19:1)
	8 M	Harnstoff
	0,5x	TBE
	500 µl/ 100 ml	APS
	50 µl/ 100 ml	TEMED
RNA-Polyacrylamid-Gele (nativ)	6 %	Polyacrylamid (80:1)
	4 %	Glyzerin
	0,5x	TBE
	500 µl/ 100 ml	APS
	50 µl/ 100 ml	TEMED
SDS-Polyacrylamid-Gele		
5%ige Sammelgellösung	1.6 ml	Acrylamid-Lsg. (37.5:1)
	1.5 ml	SDS- Sammelgelpuffer 4x
	7.8 ml	ddH2O
	20 µl	TEMED
	100 µl	10% APS
12%ige Trenngellösung	4,4 ml	Acrylamid-Lsg. (37.5:1)
	2,5 ml	SDS- Trenngelpuffer 4x
	3 ml	ddH2O

	50 µl	TEMED
	50 µl	10% APS
SSC-Puffer	150 mM	NaCl
	15 mM	Natriumcitrat
10x TBT	1,5 M	NaCl
	60 mM	Tris-Base
	190 mM	Tris/HCl
	5 % (v/v)	Tween 20
TCA-Waschpuffer	70% (v/v)	Aceton
	20% (v/v)	Ethanol
	7,5% (v/v)	ddH <sub>2</sub> O
	50 mM	Tris/HCl
	pH 8,0	
Tfb I Puffer	30 mM	KOAc
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	15% (w/v)	Glyzerin
	pH 5,8	
Tfb II Puffer	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	RbCl
	15% (w/v)	Glyzerin
10x Towbin	250 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	35 mM	SDS
Bei Gebrauch:	100 ml	10x Towbin
	800 ml	ddH <sub>2</sub> O
	100 ml	Methanol

## Material

---

W1-Puffer	0,1 M 0,5 M pH 4,0	NaOAc NaCl
W2-Puffer	0,1 M 0,5 M pH 9,0	Tris/HCl NaCl
<b>3.2.2 Gelelektrophoresepuffer</b>		
SDS-Sammelgelpuffer 4 x	0,5 M 0,4 % (w/v) pH 6,8	Tris/HCl SDS
SDS-Trenngelpuffer 4 x	1,5 M 0,4 % (w/v) pH 8,8	Tris/HCl SDS
10x Lämmli-Puffer	440 mM 2 M 1,5% (w/v) pH 8,3	Tris-base Glyzin SDS
10x TAE	0,04 M 0,11% (v/v) 0,01 M	TrisHCl Eisessig EDTA
10x TBE	890 mM 890 mM 20 mM pH 8,3	Tris H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> EDTA

### 3.2.3 Probenpuffer

DNA-Probenpuffer	10 mM	Tris/HCl
	50 mM	EDTA
	1% (w/v)	SDS
	30% (w/v)	Glyzerin
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
	pH 8,0	
Protein-Probenpuffer 4x	400 mM	Tris/HCl
	50 % (w/v)	Glyzerin
	5 % (w/v)	SDS
	5 mM	EDTA
	1 ‰ (w/v)	Bromphenolblau
	pH 6,8	
Bei Gebrauch	0,9 Vol	Protein-Probenpuffer 4x
	0,1 Vol	β-Mercaptoethanol
Protein-Probenpuffer 10x	209 mM	Tris/HCl
	41% (w/v)	Glyzerin
	7,7 % (w/v)	SDS
	5 mM	EDTA
	3 ‰ (w/v)	Bromphenolblau
	pH 6,8	
Bei Gebrauch	0,83 Vol	Protein-Probenpuffer 4x
	0,17 Vol	β-Mercaptoethanol
Harnstoff-Protein-Probenpuffer	8 M	Harnstoff
	5 % (w/v)	SDS
	200 mM	Tris/HCl
	1 mM	EDTA
	1 ‰ (w/v)	Bromphenolblau
	Bei Gebrauch	0,9 Vol

## Material

---

	0,1 Vol $\beta$ -	Mercaptoethanol
Denaturierender RNA-Probenpuffer	80 % (v/v)	Formamid
	0,1 %	Xylencyanol
	0,1 %	Bromphenolblau
	0,5x	TBE
Nativer RNA-Probenpuffer	16 % (w/v)	Glyzerin
	10 mg/ml	Heparin
	0,1%	Xylencyanol
	0,1 %	Bromphenolblau
	0,5x	TBE

### **3.2.4 Medien und Zusätze für die Gewebekultur**

Dulbecco´s modified eagle´s medium (DMEM) PAA, Linz (Österreich)

Fötales Kälber Serum (FKS) PAA, Linz (Österreich)

G418 Sigma, München

Phosphat gepufferte Saline (PBS) PAA, Linz (Österreich)

Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) Gibco, Karlsruhe

Trypsin/EDTA Gibco, Karlsruhe

#### **3.2.4.1 Medienzusammensetzungen**

HeLa-Standardmedium DMEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep

HEK293Standardmedium DMEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep

---

Cryopreservationmedium	DMEM, 10% (v/v) DMSO
------------------------	----------------------

### **3.2.5 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur**

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Clontech, Heidelberg
Bacto-Trypton	Clontech, Heidelberg
Bacto-Yeast-Extract	Clontech, Heidelberg
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche, Mannheim
Kanamycin	Boehringer, Mannheim

#### **3.2.5.1 Medienzusammensetzungen**

LB-Medium	0,5 %	Hefe-Extrakt
	1 %	Trypton
	170 mM	NaCl
Superbroth-Medium	3,5 % (w/v)	Bactotrypton
	2 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
DYT-Medium	1,6 % (w/v)	Trypton
	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl

Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agarose hergestellt. Selektionsmedien enthielten 100  $\mu$ g/ml Ampicillin oder 50  $\mu$ g/ml Kanamycin.

### 3.3 Oligonukleotide

Für Transfektionen in HeLa oder HEK 293 Zellen wurden folgende siRNAs eingesetzt.

#### LARP7

Sense 5' - GCCCAUUCCAGCCUUAAGA -3'  
 Antisense 5' - UCUUAAGGCUGGAAUGGGC -3'

#### LARP7

Sense 5' - ACAGGUGCUUGCAGAUUU -3'  
 Antisense 5' - AAUAUCUGCAAGCACCUGU -3'

#### HEXIM1

Sense 5' - GGCGUCACUGCAGGAAUUA -3'  
 Antisense 5' - UAAUCCUGCAGUGACGCC -3'

#### Cdk9

Sense 5' - GGGUAGUAUAUACCUGGUG -3'  
 Antisense 5' - CACCAGGUAUAUACUACCC -3'

#### HIV-1 p24

Sense 5' - CUCUAAGAGCCGAGCAAGC -3'  
 Antisense 5' - GCUUGCUCGGCUCUUAGAG -3'

### 3.4 Plasmide

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

<b>Protein</b>	<b>AS</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Referenz</b>	<b>5' -3' RS</b>
LARP7	1-589	pGEX6P-1	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
LARP7	1-589	pET28-a	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
LARP7	1-589	VP5	diese Arbeit	EcoR1-Not1
LARP7	375-589	pGEX6P-1	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
LARP7	1-140	pGEX6P-1	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
LARP7	1-196	pGEX6P-1	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
LARP7	141-589	pGEX6P-1	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
Cdk9	1-372	pGEX6P-1	diese Arbeit	Sal1-Not1
Cdk9	1-372	pET28-a	diese Arbeit	Sal1-Not1
HEXIM1	1-359	pGEX6P-1	diese Arbeit	EcoR1-Xho1

HEXIM1	1-359	pET28-a	diese Arbeit	EcoR1-Xho1
Cyclin T1	1-726	pGEX6P-1	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
Cyclin T1	1-726	pET28-a	diese Arbeit	EcoR1-Sal1
Tat wt	1-86	pSV2	A. Meyerhans Saar-Universität	-
Tat mut	1-86	pSV2	A. Meyerhans Saar-Universität	-
La	1-408	pET28-a	M. Grimm (Würzburg)	-
mxc	1-1837	pMTagIt	Kroiss et al., 2008	-

### 3.5 Antikörper

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

<b>Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Referenz/ Hersteller</b>
anti-FLAG	FLAG-tag	Maus, monok.	Sigma
Anti-HA	HA-tag	Maus, monok.	Roche
LARP7	His-LARP7	Kaninchen, polyk.	diese Arbeit
LARP7 C-term	His-LARP7 375-589	Kaninchen, polyk.	diese Arbeit
HEXIM 1	HEXIM1 300-359	Kaninchen, polyk.	Abcam
Cdk9	Cdk9	Kaninchen, polyk.	Abcam
Cyclin T1	Cyclin T1	Kaninchen, polyk.	Abcam
7B10	SMN 1-20	Maus, monok.	Meister et al., 2000
anti-Maus IgG Peroxidase- konju		Ziege, polyk.	Sigma
anti-Kaninchen IgG Peroxidase-konju		Ziege, polyk.	Sigma
anti-Maus IgG FITC-konju.		Ziege, polyk.	Sigma

## Material

---

anti-Maus IgG Rhodamin-konju.	Ziege, polyk.	Sigma
anti-Kaninchen FITC-konju.	Ziege, polyk.	Sigma
anti-Kaninchen Rhodamin-konju.	Ziege, polyk.	Sigma

### 3.6 Organismen und Zelllinien

*E. coli* XL1-Blue

strain: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

*E. coli* BL21

strain: *E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal

*E. coli* BL21-Rosetta

strain: *E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal

NIH HeLa S3

humane Cervix-Karzinomzelllinie

HEK 293

humane embryonale Nieren-Karzinomlinie

TZMbl

humane Cervix-Karzinomzelllinie mit stabil integrierter *P. photinus* Luziferase unter der Kontrolle eines HIV-1 LTR Promotors.

## 4 Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Plastikgefäße wurden soweit nicht anders angegeben autoklaviert (20 min bei 120 °C) und alle Glasgeräte gebacken (2 h bei 150 °C).

### 4.1 Methoden der Gentechnik und Molekularbiologie

#### 4.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

##### 4.1.1.1 Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NH<sub>4</sub>OAc (pH 5,2) und 3 Vol 96 % Ethanol bzw. 0,7 Vol Isopropanol für mindestens 30 min bei -20 °C. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (17000 g, 4 °C, 10 min) pelletiert, nach Abnahme des Überstandes mit 1 Vol. kaltem (-20 °C) 70 % Ethanol gewaschen und erneut (13000 g, 4 °C, 10 min) zentrifugiert. Das Nukleinsäurepellet wurde im Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O oder Puffer (TE) aufgenommen.

##### 4.1.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Proben erfolgte in Ethidium-Bromid-haltigen (0,5µg/ml) Agarosegelen auf der Basis von 0,5xTBE-Puffer. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8- bis 2,5 %ige Agarosegele eingesetzt. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 100V bis 200V angelegt. Banden wurden bei langwelligem UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht und digital archiviert.

##### 4.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Nukleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 und 280 nm gegen das Lösungsmittel als Referenz. Um eine passende Konzentration zwischen 0,05 und 50 µg/ml zu erreichen, wurden die Proben entsprechend verdünnt.

## **4.1.2 Methoden zur DNA-Präparation und -Analyse**

### **4.1.2.1 Isolierung von Plasmid- DNA**

Für die Isolation von Plasmiden aus E.coli Bakterien im kleinen Maßstab („Mini-Präp“) wurden 2 ml LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (110 rpm). Die Übernachtskultur wurde in 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung P2 wurde durch 4-6maliges Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eisgekühlter Puffer P3 zugegeben, der Ansatz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (13000 rpm, 10 min) wurde der Überstand mit 1000µl Ethanol gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 13000 g pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft oder unter Vakuum getrocknet und in 25 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab („Maxi-Präp“) wurden das Qiagen Plasmid Purification Kit oder das Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System verwendet.

### **4.1.2.2 Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Sämtliche Reaktionen wurden mit Pfu-Polymerase von MBI Fermentas nach folgendem Protokoll durchgeführt:

#### Reaktionsansatz

5µl	Polymerase-Puffer
50 ng	DNA
0,5 mM	dNTPs
50 pmol	5´-Primer
50 pmol	3´-Primer
1U	DNA-Polymerase
ad	50µl H <sub>2</sub> O

Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur beider DNA-Oligonukleotide (Primer),

alle anderen Parameter nach den allgemeinen Standards gewählt (95°C Denaturierung, 70°C Elongation, etc.). In der Regel wurden 35 Reaktionszyklen durchgeführt. Zur Aufreinigung der erhaltenen PCR-Fragmente wurde das Qiagen PCR Purification Kit verwendet.

#### **4.1.3 Gerichtete *in vitro* Mutagenese**

Die gerichtete *in vitro*-Mutagenese von Plasmiden wurde in abgewandelter Form nach dem Protokoll des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits“ der Firma Stratagene über PCR durchgeführt. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden sollte, diente dabei als Matrize für die Synthese des zu mutagenisierenden Plasmids. Die dabei verwendeten Primer-Oligonukleotide wurden zueinander komplementär gewählt und enthielten die gewünschten Sequenzänderungen. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl wurden 25 ng Plasmid, je 5 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 5 nmol der vier dNTPs, 2,5 µl 10 x Pfu-Polymerasepuffer, 1,5 U Pfu-DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH<sub>2</sub>O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 12 bis 16 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 95°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 55°C und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt, mit 10 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde die methylierte DNA des Stammplasmids selektiv abgebaut. 5 µl dieses Reaktionsansatzes wurden direkt in kompetente Bakterien transformiert.

##### **4.1.3.1 Sequenzierung von DNA mit „AmpliTaq polymerase FS Big Dye Terminator“**

Die Sequenzierung von DNA wurde entweder mit dem hauseigenen ABI PRISM Genetic Analyzer oder bei der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt. Die entsprechende Menge DNA (5- 100 ng PCR-Produkt; 100 ng ssDNA oder 500 ng dsDNA) wurde mit 3-5 pmol Primer hybridisiert (94 °C, 2 min), anschließend mit 2 µl BigDye-Terminator-Mix versetzt und in 25 Reaktionszyklen amplifiziert. Der Ansatz wurde

im Anschluss daran Alkohol präzipitiert und das Pellet zur Sequenzierung 30 µl Formamid (HiDi) aufgenommen.

### **4.1.3.2 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Je 1 µg DNA wurden 1 bis 3 U Restriktionsenzym eingesetzt. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug, bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur, mindestens 2 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol DNA Probenpuffer beendet. DNA-Doppelspaltungen erfolgten in den geeigneten Puffern nach den Angaben der Hersteller oder wurden, falls dies nicht möglich war, seriell durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen aus den Reaktionsansätzen isoliert.

### **4.1.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase**

Um bei ungerichteten Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung durch die geeignete Restriktionsendonuklease angeschlossen. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 1 µl CIAP versetzt, 30 min bei 37°C inkubiert und die anschließend bei 65°C für 15 min abgebrochen.

### **4.1.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

In einem Endvolumen von 10-20 µl wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA und ein dreifacher, fünffacher bzw. zehnfacher molarer Überschuss des DNA-Fragments mit 1-2 µl Ligasepuffer und 1 U T4-DNA-Ligase 3-4 h oder über Nacht bei RT inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden direkt zur Transformation kompetenter Zellen eingesetzt.

### **4.1.3.5 Präparation kompetenter Bakterienzellen**

Hitzekompetente *E.coli* wurden nach der Methode von Hanahan (Hanahan and Meselson 1983) gewonnen. 1 ml DYT-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert (180 rpm). Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium beimpft und bis zu einer optischen Dichte  $OD_{600} = 0,5$  geschüttelt. Hatte die Kultur die geforderte Zelldichte erreicht, wurde die Zellsuspension auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml

Zentrifugenröhrchen überführt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vorsichtig in 33,3 ml eiskalter Tfb I-Lösung resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 5 min) und nach Entfernen des Überstandes in 8 ml eisgekühlter Tfb II-Lösung aufgenommen. Die hierdurch durch kompetent gemachten Bakterien wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können so mehrere Jahre bei -80 °C gelagert werden.

#### **4.1.3.6 Transformation kompetenter Bakterienzellen**

Tiefgefrorene kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und 30µl bis 50µl Zellen mit mindestens 10ng DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C behandelt und sofort wieder auf Eis transferiert. Nach weiteren 2 Minuten wurden die Proben mit DYT-Medium ohne Antibiotikum auf 500µl aufgefüllt und zur Regeneration für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen konnten dann entweder auf Agarplatten ausplattiert oder in Flüssigkultur aufgenommen und über Nacht bei 37°C kultiviert werden.

#### **4.1.3.7 Anlegen von *E. coli* Glycerol-Kulturen**

Zur Lagerung von transformierten Bakterien bei -80°C wurden 650µl einer dichtgewachsenen Kultur mit 350µl Glycerol 87% versetzt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Um Kulturen aus Gefrierstocks anzusetzen, wurde mit einer Pipettenspitze ein wenig der gefrorenen Bakterien abgekratzt und in Flüssigkultur aufgenommen.

#### **4.1.3.8 Kolonie-PCR-Analyse**

Kolonie-PCR (Gussow and Clackson 1989) wurde als Alternative bzw. zusätzlich zur Kontrolle durch Restriktionsverdau und anschließende Analyse im 1 %igen Agarosegel eingesetzt. Für jede zu analysierende Kolonie und wurden 20 µl Reaktionsmix vorbereitet. Jeweils ein zu untersuchender Klon wurde mit einer sterilen Pipettenspitze auf eine entsprechende Replikplatte übertragen und in jeweils einen vorbereiteten Reaktionsmix übertragen. Die Bedingungen der PCR-Reaktion während des ersten Denaturierungsschrittes wurden so

gewählt, dass die Bakterienzellwände aufgebrochen wurden (94 °C, 2 min). Die anschließende PCR erfolgte wie unter 4.1.2.2 beschrieben, jedoch in 30 Zyklen und einer Elongationstemperatur von 72 °C.

*Reaktionsmix*

0,25 µM	5'-Oligonukleotid
0,25 µM	3'-Oligonukleotid
200 µM	dNTP-Mix
1x	Taq-Polymerase-Puffer ( MgCl <sub>2</sub> )
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05 U/µl	Taq DNA Polymerase
ad 20 µl	ddH <sub>2</sub> O

**4.1.4 Reverse Transkription (RT-PCR)**

Das erstmals von H. Temin und später von D. Baltimore beschriebene Enzym Reverse Transkriptase, ermöglicht eine selektive Amplifikation von RNAs unter der gleichzeitigen Bildung von stabiler cDNA (Baltimore 1970; Temin and Mizutani 1970). Hierzu wurde eine gentechnisch veränderte Variante der Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV-RT) mit reduzierter RNase H-Aktivität und verbesserter Thermostabilität verwendet (Superscript II, Invitrogen, Karlsruhe). Die Amplifikation der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei im Anschluß eine PCR, wie unter 4.1.2.2 beschrieben durchgeführt wurde.

7SK RNA-1	5'-TGTGAGGCGATCTGGCTG-3'
7SK RNA-2	5'-GCTACTCGTATACCCTTG-3'
7SL RNA-1	5'-GTGCCTGTAGTCCCAGCT-3'
7SI-RNA-2	5'-CTCCCGTGCTGATCAGTA-3
S6-1	5'-CTGGACTGACTGATACTACAGTGCC-3'
S6-2	5'-CAATACGCCTCCGTTTGTGCTGC-3'
FeLC-1	5'-CTTGCAACCTCCGGGACCATCTTC-3'
FeLC-2	5'-CATCATCGCGGTCGAAATAGAAGCC-3'

#### 4.1.5 Quantitative Real-Time PCR

Quantitative Real-Time PCR Analysen wurden mithilfe eines Stratagene MX 3000P Cyclers und des ThermoABSolut QPCR SYBR Green mix (ABgene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden basierend auf Angaben der *universal probe library* der Firma Roche gewählt:

18S-1	5'-TTTTTCGGGTGGAAAACC-3'
18S-2	5'-AGTTCGACCGTCTTCTCAGC-3'
Hexim1-1	5'-GCAGCGTCATCGGTAGTTTT-3'
Hexim1-2	5'-AGGGTAAGTCCAGTGCGTGA-3'
Larp7-1	5'-TGGAAGCTCGAGATCCTTTCTG-3'
Larp7-2	5'-GTTTTGCCTGTCTATCAACCAA-3'
Cdk9-1	5'-TTCGGGGAGGTGTTCAAG-3'
Cdk9-2	5'-ATCTCCCGCAAGGCTGTAAT-3'
HSP70-1	5'-GGAGTCCTACGCCTTCAACA-3'
HSP70-2	5'-CCAGCACCTTCTTCTTGTCG-3'
TGM2-1	5'-AGGGTGACAAGAGCGAGATG-3'
TGM2-2	5'-TGGTCATCCACGACTCCAC-3'
7SK RNA-1	5'-TGTGAGGCGATCTGGCTG-3'
7SK RNA-2	5'-GCTACTCGTATACCCTTG-3'

PCR-Reaktionen erfolgten nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 1 min in 40 Zyklen von 95° für 30 s, und 60° für 30 s. Die einzelnen Reaktionen wurden in dreifacher Ausführung und zur Kontrolle jeweils einmal ohne cDNA analysiert. Die erhaltenen Werte wurden daraufhin anhand des Schwellenwerts der exponentiellen Reaktion gewählt und auf die Transkription der 18S rRNA normiert. Hierzu wurden die Mittelwerte der Einzelreaktionen gebildet, von diesen der jeweilige Wert der 18S rRNA subtrahiert und auf diesen normiert. Die erhaltenen Werte  $n$  lieferten dann nach der Beziehung  $2^{(-n)}$  die auf die Transkription der 18S rRNA normierten Transkriptionslevel der zu untersuchenden RNA Spezies.

## **4.2 Biochemische Methoden**

### **4.2.1 Grundlegende Methoden der Protein-Biochemie**

#### **4.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte entweder anhand eines Vergleichs einer gereinigten Proteinprobe mit einem Rinderserumalbumin-Standard (BSA) im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE oder nach der Methode von Bradford (*Bradford 1976*). Zur Messung wurde zunächst mithilfe des Bradford-Reagenz (Bio-Rad) eine Eichkurve über 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg BSA erstellt. Parallel wurden 5 µl der Probe mit ddH<sub>2</sub>O auf 800 µl aufgefüllt, ebenso mit 200 µl Reagenz versetzt und nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei 595 nm vermessen.

#### **4.2.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli 1970) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zur Herstellung eines Gels wurde die Trenngellösung direkt nach Zugabe von TEMED und APS luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten bis zu einer Höhe von 2 cm vom oberen Rand her gegossen und zur Glättung der Gelkante vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel eingegossen und ein geeigneter Taschenformer eingesetzt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 4x bzw. bei großen Probenvolumina mit 10x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und in die zuvor mit 1x Lämmli-Puffer gespülten Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer BioRad MiniProtean III-Kammer bei 80 mA/Gel und 50W/Gel für ca. 35 min.

#### **4.2.1.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Das SDS-Gel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung bis zum Erreichen des optimalen Kontrasts entfärbt. Das Gel wurde digital

archiviert und zur dauerhaften Fixierung zwischen zwei feuchten Cellophanfolien auf dem Gelrockner 2 h bei 80 °C getrocknet.

#### 4.2.1.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung von SDS-Gelen mit Silber weist gegenüber der Coomassiefärbung eine wesentlich höhere Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von 50-100 pg Protein je Bande auf. Darüber hinaus eignet sich diese erstmals von Merril *et al.* 1981 etablierte Methode für eine anschließende massenspektrometrische Analyse des Gels (Merril, Dunau *et al.* 1981). Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel nach SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine mindestens 2 h in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 min mit 50% Ethanol p.a. gewaschen, für eine Minute in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat inkubiert und dreimal mit ddH<sub>2</sub>O für je 20 s gewaschen. Das Gel wurde dann für 20 min in Silberlösung imprägniert, zweimal 20 s mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und entwickelt. Nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde das Gel kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und die Reaktion mit Fixierlösung ohne Formaldehyd gestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel in 50 % (v/v) Methanol überführt und dokumentiert.

Fixierlösung:	50% (v/v)	Methanol
	12% (v/v)	Essigsäure
	0,05% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung
Silberlösung:	2 g/l	Silbernitrat
	0,075% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung
Entwickler:	60 g/l	Natriumcarbonat (wasserfrei)
	0,05% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung

#### 4.2.1.5 Autoradiographie von Elektrophoresegelen

Durch Autoradiographie können radioaktiv markierte Proteine auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Da die Emissionsenergie meist relativ schwach ist und der *quenching*-Effekt der Gelmatrix die Emissionsenergie zusätzlich mindert, kann die Detektionseffizienz nach der Auftrennung der Proteine unter Verwendung von Szintillatoren gesteigert werden (Bonner und Laskey, 1974). Das Prinzip der

Szintillation beruht darauf, daß die ausgesendeten Elektronen über Lösungsmittelmoleküle Fluorophore anregen, deren Fluoreszenz dann durch Photomultiplier gemessen wird oder zur Schwarzfärbung eines Röntgenfilms führt. Zur Sichtbarmachung radioaktiv ( $[^{35}\text{S}]$  oder  $[^{32}\text{P}]$ ) markierter Proteine wurden die Gele zweimal für 30 min in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure gewaschen und fixiert, anschließend 30 min in Amplify-Lösung (Amersham) inkubiert, auf eine Lage Filterpapier überführt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die getrockneten Gele wurden zur Verstärkung der radioaktiven Signale in „Transcreen HE-“ (für  $[^{32}\text{P}]$ ) oder „Transcreen LE-“ (für  $[^{35}\text{S}]$ ), (Amersham Pharmacia Biotech) Verstärkerfolie eingeschlagen und bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

## **4.2.2 Immunologische und Immunbiochemische Methoden**

### **4.2.2.1 Western-Blotting und reversible Färbung mit Amidoschwarz oder Ponceau S**

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine und Proteinkomplexes können zur weiteren Charakterisierung auf einer Membran immobilisiert werden. Dieses als Western-Blotting bezeichnete Verfahren wurde 1979 von Towbin *et al.* entwickelt und zur Verwendung von Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen durch Gültiken erweitert (Towbin, Staehelin *et al.* 1979; Gultekin and Heermann 1988). Für den Transfer wurde eine Semi-Dry-Blotapparatur verwendet. Das SDS-Gel wurde zwischen je 3 Lagen in 1x Towbin Puffer getränktem Filterpapier auf einer Nitrozellulosemembran oder einer in 100 % Methanol äquilibrierten PVDF Membran plaziert. Der Transfer erfolgte 2 h bei Raumtemperatur und 0,8 mA je cm<sup>2</sup> Gelfläche. Zur Kontrolle der Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosemembranen erfolgte eine reversible Anfärbung mit Ponceau S. Bei Verwendung von PVDF-Membran wurde die Membran 10 min in Amidoschwarz gefärbt, anschließend zweimal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 90 % Ethanol mit 10 % Essigsäure entfärbt.

#### 4.2.2.2 Immunoblot-Analyse

Zur Blockierung aller potentiellen unspezifischen Antikörperbindungsstellen auf der Nitrocellulose- oder PVDF-Membran nach dem Blotvorgang wurde diese mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung (1x TBT mit 5 % (w/v) Magermilchpulver) bzw. über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach dem Waschen mit 1x TBT wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit dem gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Primärantikörper in einer geeigneten Verdünnung in 1x TBT vorsichtig bewegt. Nach Entfernen von ungebundenen Primärantikörpern durch dreimaliges Waschen mit 1x TBT für je 10 min, konnte ein gegen den ersten Antikörper gerichteter, an Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper, nach Bedarf in 1x TBT verdünnt, 1 h bei Raumtemperatur binden. Ungebundener Sekundärantikörper wurde anschließend erneut dreimal 10 min mit 1x TBT gewaschen. Die Sichtbarmachung der spezifischen Proteine erfolgte mit dem *enhanced chemoluminescence system* (ECL). Dafür wurden 10 ml ECL II-Lösung mit 150 µl ECL I -Lösung und 8 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt, die Membran für eine Minute in dieser Lösung inkubiert und anschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert.

#### 4.2.2.3 Immunpräzipitation von Proteinen

Mittels Immunpräzipitation können Antigene und ihre Komplexpartner spezifisch und selektiv isoliert werden. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen ausgeführt. Zunächst wurde der spezifische Antikörper durch Bindung an Protein G-Sepharose immobilisiert. Hierzu wurden 25 µl Protein G-Sepharose je Ansatz mit 250 µl IP-Puffer gewaschen, um restliches Ethanol zu entfernen. Nach Zugabe von ca. 1-3 µg des spezifischen Antikörpers wurde der Ansatz 1 h (Überkopfröhrator) bei 4 °C inkubiert. Durch anschließendes dreimaliges Waschen mit IP-Puffer und einen Wechsel des Reaktionsgefäßes vor dem vierten Waschschrift wurden ungebundene und unspezifisch an der Gefäßwand haftende Antikörper beseitigt. Sollten die Beads mit dem Antikörper mehrmals verwendet werden, wurde dieser kovalent gekoppelt. Dazu wurde kurz mit 0,2 M Natriumtetraborat gewaschen und der Antikörper danach mit 20mM Dimethylpimelimidat in 0,2M Natriumtetraborat für 30 min mit Protein

G quervernetzt. Freie, noch reaktive Gruppen wurden danach für 2h in 0,2M Ethanolamin pH 8,0 (oder 150mM NaCl; 50mM Tris pH7,5; 0,01% Igepal) geblockt.

Zur Antigen-Antikörperkomplexbildung (Immunpräzipitation) wurde die Suspension mit 400 µl IP-Puffer versetzt und mit dem entsprechenden Extrakt (3 µl *in vitro*-Translat) 1 h inkubiert (Überkopfröhrator, 4 °C). Nach erneutem Waschen (4x) mit Wechsel des Reaktionsgefäßes wurde die Sepharose in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5-10 min bei 95 °C denaturiert. Alternativ erfolgte eine Elution der Proteine durch zweimalige Zugabe von je 650 µl Glycin pH 2,7. Die mit 200 µl TCA für 10 min auf Eis gefällten Proteine wurden für 15 min bei 16000 g abzentrifugiert, mit TCA-Waschpuffer gewaschen und nach Trocknung im Vakuum in einem geeigneten Volumen Protein-Probenpuffer aufgenommen. So erhaltene Proben wurden weiterhin mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

#### **4.2.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Adhärente willdtypische oder zuvor transfizierte Säugerzellen (24 h nach der Transfektion) wurden auf sterile Deckgläschen in „6-Loch“-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40 % kultiviert. Die Zellen wurden direkt nach Absaugen des Standardmediums bei RT mit je 4 ml Paraformaldehydlösung pro Loch für 7 min auf den Deckgläsern fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 4 ml einer Triton-X-100-Lösung pro Loch für 5 min auf Eis permeabilisiert und anschließend zweimal mit 2 % BSA in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:50 – 1:1000, je nach eingesetztem Antikörper, verdünnt in 2 % BSA in PBS) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut 2 mal mit 2 % BSA in PBS gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper (FITC- oder Rodamin-konjugierte Antikörper, 1:100 in Blocklösung) im Dunklen inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen, und mit 10 µl "Vecta Shield" überschichtet und mittels Nagellack auf einem Objektträger fixiert und abgedichtet. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Auflichtfluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen) mit den Zeiss-Standardfiltersätzen, einer AxioCam MRm

und der Bildaufnahmesoftware AxioVision 4.6. Für die konfokale Laserscanningmikroskopie wurde ein Leica TCS SP2 AOBS verwendet.

#### **4.2.2.5 Gewinnung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren**

Zur Herstellung des Antigens wurden die jeweiligen Proteine bzw. Proteinfragmente als 6xHis-Fusionen rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte im 2 Wochen Abstand über einen Zeitraum von 2 Monaten in einer jeweiligen Dosis von 250 µg durch die Fa. Immunoglob (Himmelstadt).

Zur Affinitätsreinigung des Antikörpers aus den gewonnenen Seren wurden 2-4 mg des als GST-Fusionsprotein exprimierten Antigens zunächst kovalent an Glutathion-Sepharose Matrix gekoppelt. Dazu wurde diese auf Raumtemperatur überführt, mit 0,2 M Natriumtetraborat gewaschen und mit 20mM Dimethylpimelimidat in 0,2M Natrium-Tetraborat für 30 min quervernetzt. Freie, noch reaktive Gruppen wurden danach für 1h in 0,2M Ethanolamin pH 8,0 (oder 150mM NaCl; 50mM Tris pH7,5; 0,01% Igepal) geblockt. Anschließend wurde die Matrix mit 10 Vol. 0,1 M Glyzin pH 2,7 gewaschen, um so eine möglichst quantitative Kopplung des Antigens sicherzustellen, in PBS äquilibriert und mit 10 ml Serum für 2 h inkubiert. Die Elution des gebunden Antikörpers erfolgte nach mehrfachem Waschen mit PBS durch pH-Schock mit 0,1 M Glycin pH 2,7, wobei die jeweiligen Elutionsvolumina mit 10 % 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8 gepuffert wurden. Antikörper enthaltende Fraktionen wurden im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und gegen 50 Vol. PBS bei 4° C über Nacht dialysiert.

### **4.2.3 Proteinexpression und -reinigung**

#### **4.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli***

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die entsprechenden Plasmid-Konstrukte in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) oder BL21-Rosetta transformiert und eine Einzelkolonie auf 200 ml bis 2 l Superbroth-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin für GST-Fusionsproteine oder 50 µg/ml Kanamycin für His-Fusionsproteine überimpft. Expressionen in BL21-Rosetta enthielten zusätzlich 40

µg/ml Chloramphenicol. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Proteinexpression bei einer OD600 von 0,5 - 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4-12 h bei 16°C, 25°C oder 37°C, je nach Protein, wurden die Zellen abzentrifugiert (4500 g, 10 min 4 °C), einmal mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert (4200 g, 10 min) und direkt weiter aufgearbeitet oder bei -80°C gelagert.

### **4.2.3.2 Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen**

Alle Schritte wurden zur Verminderung von Proteaseaktivität auf Eis bzw. in vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt. Proteine wurden rekombinant als GST- oder His-Fusionsproteine in E.coli exprimiert und daraus gereinigt. Zur Aufreinigung wurde das Bakterienpellet in 10 ml GST-Aufschlusspuffer für GST-Fusionsproteine bzw. HIS-Aufschlusspuffer für 6xHis-Fusionsproteine aufgenommen und unter Zugabe von 5 mg/ml Lysozym 30 min inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Zellaufschluss durch Sonifikation mit einem Branson Sonifier 250 (50% Duty Cycle, Output Control 8) in 10 Zyklen a 30 s, gefolgt von 30 s Pause auf Eis. Die aufgebrochenen Bakterienzellen wurden zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min bei 30000 g zentrifugiert. Parallel dazu wurden 400 µl ProBond Nickel-Chelating Resin (Kapazität 5 mg Protein je ml) für Proteine mit His-Tag oder 300 µl Glutathion Sepharose (Kapazität 10 mg Protein je ml) bei Proteinen mit GST-Tag in 1x PBS gewaschen. Die Sepharose wurde anschließend mit dem Bakterienlysat versetzt und 1 h bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. Das immobilisierte Protein wurde dreimal mit dem jeweiligen Aufschlusspuffer gewaschen, wobei bei 6xHis-Fusionsproteinen zusätzlich 10 mM Imidazol zugegeben wurde. Die Elution erfolgte bei 6x-His-Fusionsproteinen durch Zugabe von 300 mM Imidazol, bei GST-Fusionen durch 20 mM Glutathion in PBS bei pH 8,0. Alternativ wurde der GST-Fusionsanteil mithilfe eines PreScission-Protease-Verdaus entfernt, um so dessen potentiell störenden Einfluss in EMSA Analysen zu verhindern. Vorteilhaft bei dieser Methode erweist sich die Präzision der Protease, deren Schnittstelle im Expressionsvektor des Fusionsproteins kodiert wird, sowie deren Verbleiben an der Matrix nach der Reaktion. Hierzu wurde das immobilisierte GST-Protein mit einer geeigneten Menge PreScission-Protease für 2-16 h bei 4 °C inkubiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-Page und

Coomassie-Färbung analysiert und gegen PBS bzw. die benötigten Puffer dialysiert. Zur weiteren Verwendung wurden die Proteine bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.2.3.3 Dialyse von Proteinen und Proteinkomplexen**

Um störende Einflüsse von Salzen oder anderen Substanzen wie Imidazol für Folgereaktionen zu vermeiden, wurden rekombinant hergestellte Proteine, gewonnene Antikörper oder Proteinkomplexe dialysiert. Die Eluate wurden hierzu in einem Dialyseschlauch/-kammer geeigneter Ausschlußgröße über Nacht in 2,5l entsprechendem Dialysepuffer langsam bewegt (Rührer). Durch Zugabe von 20% Glycerin (v/v) in den Dialysepuffer wurde einer Verdünnung der Proteinprobe vorgebeugt. Ein zweiter Dialyseschritt für drei bis vier Stunden diente der Erhöhung der Effizienz der Dialyse.

#### **4.2.4 Gekoppelte *in vitro*-Transkription und Translation**

Zur gekoppelten *in vitro*-Transkription und -Translation wurde das „TNT Quick coupled Transkription/Translation System“ der Firma Promega verwendet. Für die radioaktive Markierung der Translationsprodukte wurde [<sup>35</sup>S]-Methionin (3000 mCi/mmol) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems konnten einzelne, für spätere Bindungsstudien radioaktiv markierte Proteine hergestellt werden. Voraussetzung ist hierbei ein Vektor mit T7-Promotor, weshalb die Vektoren pET21a oder pET28a eingesetzt wurden. Für einen typischen Reaktionsansatz (~ 25 µl) wurden 1 µg der jeweiligen Plasmid-DNA mit 20 µl Retikulozytenlysate und 2 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin (15 µCi/µl) versetzt und 90 min bei 30 °C inkubiert. Zur Überprüfung des Erfolgs der Translation wurde 1 µl des Ansatzes in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und restliches Lysat direkt für die Immunpräzipitation oder Interaktionsstudien eingesetzt bzw. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konserviert.

#### **4.2.5 Methoden zur RNA-Präparation und Analyse**

##### **4.2.5.1 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese**

Für denaturierende RNA-Gelelektrophoresen wurden 10% Polyacrylamid-Gele mit 8M Harnstoff verwendet. RNA-Proben wurden

maximal 1:5 mit denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und 3 Minuten bei 95°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Elektrophorese erfolgte bei 500V für 45 Minuten in 1x TBE.

### **4.2.5.2 Native RNA-Gelelektrophorese**

Für native RNA-Gelelektrophoresen wurden 6% Polyacrylamid-Gele mit 4% Glycerin verwendet. Die Proben wurden möglichst 1:1, maximal 1:2, mit nativem RNA-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Polyanion Heparin im Probenpuffer verringert hierbei unspezifische RNA-Protein-Interaktionen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25mA für etwa 90 Minuten in 1x TBE bei 4°C, um mögliche Konformationsänderungen in der RNA oder den Proteinen aufgrund des sich erwärmenden Gels zu verhindern. Im Anschluss wurde das Gel für 12 h bei -80 °C gegen einen Biomax MR Film exponiert

### **4.2.5.3 In vitro-Transkription**

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 bzw. SP6 lassen sich DNA-Sequenzen, die unter Kontrolle des entsprechenden Promotors stehen, *in vitro* transkribieren (Milligan and Uhlenbeck 1989) . In einem Volumen von 25 µl wurden 1-2 µg linearisierte Plasmid-DNA in folgendem Reaktionsmix für mindestens 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Transkripte wurden durch Zugabe von [ $\gamma$ -32P]-UTP radioaktiv markiert

#### Reaktionsmix

1-2 µg	DNA
5 µl	RNA-Polymerase Puffer 5x
2,5 µl	DTT 0,1 M
2,5 µl	cap-analog 10 mM (Amersham)
1 µl	RNAsin (Promega)
1 µl	ATP 2,5 mM
1 µl	GTP 2,5 mM
1 µl	CTP 2,5 mM
1 µl	UTP 2,5 mM
1 µl	[ $\gamma$ -32P]-UTP, 10 µCi/µl
2 µl	RNA-Polymerase
ad 25 µl	ddH <sub>2</sub> O

Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit 7 µl denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und zur Aufreinigung auf einem denaturierenden RNA-Gel aufgetrennt.

#### ***4.2.5.4 Reinigung radioaktiv markierter RNA aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen***

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in Frischhaltefolie eingewickelt und für 3 Minuten gegen einen Biomax MR Film exponiert. Nach Unterlegen des belichteten Filmes wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 400 µl RNA-Elutionspuffer über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Rotor inkubiert. Das erhaltene Eluat wurde Alkohol präzipitiert und in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### ***4.2.5.5 Phenol-Extraktion von RNA und Protein aus Immunpräzipitaten und Extrakten***

Um RNA und Proteine aus Zellextrakten oder Immunpräzipitaten von RNPs zu trennen, wurde 1 Vol der Probe in 1 Vol PK-Puffer aufgenommen und mit 2 Vol µl Phenol (Reinheitsgrad für die RNA-Extraktion) versetzt. Nach kurzem Mischen auf dem Schüttler wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 13.000rpm getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die RNA daraus mittels Alkohol Präzipitation gefällt und das Pellet in 20µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Aus der Phenolphase wurden die Proteine mittels Aceton gefällt. Hierzu wurden die Proben mit 5 Vol eiskaltem Aceton versetzt, gut gemischt und für mindestens 1h jedoch besser über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 18000 g wurde das Proteinpellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

#### ***4.2.5.6 5'-Endmarkierung von RNA***

Zur radioaktiven Markierung von RNAs zur späteren Verwendung als Hybridisierungssonden, wurde deren 5'-Ende radioaktiv markiert. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz für 1h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden dann direkt in denaturierendem RNA Puffer aufgenommen und bei 70 °C für 10 min denaturiert.

### Reaktionsmix

3 µl	γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP (10 YCi/Yl)
1 µl	PNK-Puffer A
1 µl	Oligonucleotid (10 pmol/µl)
1 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
4 µl	ddH <sub>2</sub> O

7SK RNA-Sonde 5´-CGTATACCCTTGACCGTTGTCCg-3´

Nach Auftrennung der Proben mittels denaturierender RNA-PAGE, wurden die jeweiligen RNAs aus dem Gel gereinigt, Ethanol präzipitiert und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **4.2.5.7 Northern-Blot und RNA-Hybridisierung**

Als Ergänzung der RT-PCR wurde die Gegenwart oder Abwesenheit bestimmter RNAs mittels Northern-Blot nachgewiesen. Dazu wurde die mittels denaturierender PAGE aufgetrennte RNA in 1x TBE-Puffer auf eine zwischen 6 mit 1x TBE getränkten Filterpapieren liegende Hybond N-Membran bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> übertragen. Die auf die Membran transferierten RNAs wurden anschließend unter einer UV-Lampe bei 254 nm und einem Abstand von 1 cm für 15 min fixiert. Zur Detektion der gesuchten RNA wurde die Membran mit Rapid-Hyb-Hybridisierungspuffer (GE Life Sciences) bei 42°C in einem Hybridisierungssofen für 30 min vorinkubiert und mit der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonde in RapidHyb-Puffer für 2h bei 42°C hybridisiert. Nach Abnahme der Sonde wurde die Membran 3 x in der Hybridisierungsröhre mit 1x SSC-Puffer gewaschen, in eine Schüssel überführt und erneut mit 1x SSC-Puffer gewaschen. Die Membran wurde anschließend autoradiographisch analysiert.

#### **4.2.5.8 RNA UV-Crosslink**

Zur Detektion der Bindung RNA spezifischer Proteine aus Rohextrakten von HeLa-Zellen wurden UV-Quervernetzungsexperimente (UV-Crosslink) durchgeführt. Hierzu wurden 4x 10<sup>5</sup> cpm eines [<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotides zusammen mit 1 µg tRNA als unspezifischem Kompetitor und 2 µg Heparin in 10 µl Zellextrakt für 20 min bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei

254 nm im Abstand von 10 cm mit UV-Licht bestrahlt. Unter Zugabe von RNaseA wurde die RNA bei 37 °C für 10 min degradiert und die erhaltenen RNA-Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Analyse spezifisch RNA bindender Faktoren erfolgte mittels Autoradiographie.

wtTOP S16 Oligo 5'-CCUUUCCGGUCGCGGCGCUGCGGUGUGG-3'

mutTOP Oligo 5'-GAGUGACCGUCGCGGCGCUGCGGUGUGG-3'

#### **4.2.5.9 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

EMSA-Studien wurden zum Nachweis der Bindung rekombinant hergestellter Proteine an RNA unter nativen Bedingungen herangezogen. Hierbei wird ein gebildeter RNA-Proteinkomplex in Relation zur freien RNA im Gel stärker retardiert und so als solcher erkennbar. *In vitro* transkribierte und [<sup>32</sup>P]-markierte RNA (50000 cpm) (4.2.5.3) wurde hierzu mit 500 ng des zu untersuchenden Proteins für 20 min bei 30 °C in EMSA-Puffer inkubiert. Im Fall von Supershiftanalysen wurden 500 ng des Proteins vor Zugabe der RNA mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers bei 4°C für 30 min inkubiert. Die einzelnen Proben wurden dann mit 2 µg des Polyanions Heparin versetzt, um schwache Wechselwirkungen mit der RNA zu verhindern und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von nativem Probenpuffer wurden die Proben unverzüglich durch native PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

#### **4.2.6 Präparation von Zellextrakten**

##### **4.2.6.1 Herstellung von HeLa Gesamtzellextrakt auf Fermenterbasis**

5 x 10<sup>9</sup> HeLa-Zellen aus einer proliferierenden Fermenterkultur wurden für 12 min bei 1000 g und 4 °C pelletiert und in 2/3 des Pelletvolumens mit autoklaviertem PBS mit 0,01% Igepal (v/v) resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einem Glashomogenisator (Douncer) durch 30 bis 40 Pistillstöße aufgeschlossen und die Suspension für 15 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit PBS mit 0,01% Igepal auf 40ml Gesamtvolumen verdünnt und mit Hilfe einer Spritze mit 0,8µm- bzw. 0,45 µm- Filteraufsatz weiter geklärt. Die Extrakte wurden entweder

sofort eingesetzt oder aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **4.2.6.2 Herstellung von HeLa-Kernextrakt**

5 x 10<sup>9</sup> HeLa-Zellen aus einer proliferierenden Fermenterkultur wurden für 12 min bei 1000 g und 4 °C pelletiert und in einem fünffachen Pelletvolumen mit Roeder-A-Puffer für 10 min auf Eis gequollen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im zweifachen Pelletvolumen Roeder A Puffer erfolgte der Zellaufschluß durch 10 Pistillstöße in einem Douncer. Die Kerne wurden vom Zytoplasma durch Zentrifugation in einem Ausschwingrotor bei 1500 g für 10 min (4°C) getrennt. Nach Resuspension des Pellets (Kerne) in einem 1,5 fachen Pelletvolumen Roeder C Puffer wurden die Kerne durch 15 Pistillstöße im Douncer aufgeschlossen. Diese Suspension wurde dann für 30 min auf Eis gerührt und zentrifugiert (100000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde 2,5 h gegen Roeder D Puffer dialysiert in N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **4.2.6.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen**

Zur Herstellung von Zellextrakten von Zellen aus adhärenter Kultur wurden diese in der Zellkulturschale zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 0,5-1 ml Lysepuffer versetzt und mit einem Zellschaber von dem Gefäßboden gelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann mittels einer Pipette mehrfach geschert und 20 min auf Eis inkubiert. Für eine quantitative Lyse wurde diese zusätzlich 25 mal durch eine G25 Kanüle geschert und bei 4 °C für 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Gesamtproteingehalt des erhaltenen Überstandes wurde mittels Bradford bestimmt, einzelne Aliquote direkt eingesetzt oder schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

### **4.2.7 In vitro Protein-Bindungsanalyse**

Für Bindungsexperimente wurden eine Komponente jeweils rekombinant als GST-Fusion exprimiert und immobilisiert, während die anderen Komponenten in Form von *in vitro* translatierten Proteinen zugegeben wurden. 1-2 µg des jeweiligen mit GST fusionierten Polypeptides wurden dazu mit 30 µl Glutathion-Sepharose für 1h bei

RT am Überkopfschüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 0,01 % NP40 und Zugabe der *in vitro* translatierten (3µl) Proteine wurde die Reaktion für 2h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit IP-Puffer und Wechseln des Reaktionsgefäßes wurden ungebundene Faktoren entfernt und die Sepharose vollständig drainiert. Die an der Matrix verbliebenen immobilisierten Komplexe wurden dann durch Zugabe von 25 µl 4x SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und Autoradiographie analysiert.

#### **4.2.8 Proteintandemmassenspektrometrie (Protein-MS/MS)**

Das Verfahren der Proteintandemmassenspektrometrie dient der direkten Identifizierung unbekannter Proteine und wurde erst durch die Verfügbarkeit komplett sequenzierter Genome und Verbesserungen der Messapparaturen einer breiten Anwendung zugänglich. Die massenspektrometrische Analyse der immunaffinitätsgereinigten Komplexe wurde von Julia Wiesner am Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin in Würzburg durchgeführt. Zum Einsatz kam hierbei ein LTQ XL Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich), welches zur Konzentrierung der Probe direkt mit einer Flüssigchromatographie gekoppelt war (LC-MS/MS). Im Einzelnen wurden die Proteine von Interesse aus dem Gel ausgeschnitten, gewaschen, mit DTT reduziert und mit Jodacetamid alkyliert. Es erfolgte ein enzymatischer Verdau der Proteine im Gel durch Trypsin, und eine Aufnahme der generierten Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie in Trifluoressigsäure. Die Peptide wurden daraufhin (durch Elektronenspray-Ionisation, ESI) ionisiert, in einer (linearen) Ionenfalle gesammelt und in einem „peptide mass fingerprint“ übersichtsweise analysiert (MS). Einzelne Peptide wurden aus der Ionenfalle selektiert, durch Kollision mit Helium-Atomen fragmentiert („collision induced decay“, CID) und die Fragmentionen erneut massenspektrometrisch analysiert (MS/MS). Die auf diese Weise abgeleiteten Peptidsequenzen wurden dann mit einem *in silico*-Verdau der aus der SWISS-PROT-Datenbank erhaltenen Proteinsequenzen verglichen.

#### **4.2.9 Tobramycin-Affinitätsreinigung**

Das Aminoglycosid-Antibiotikum Tobramycin bindet effektiv RNAs, die in ihrer Sequenz die Nukleotidfolge 5'... AGGUUUAGCUACACU...3' - das sogenannte Tobra-tag - aufweisen. Diese Sequenzfolge bildet eine Stamm-Schleifen-Struktur aus, welche für die Bindung an Tobramycin entscheidend ist (Wang and Rando 1995). Aminogruppen des Tobramycins ermöglichen ferner eine Kopplung an eine N-hydroxy-succinimid (NHS) - aktivierte Sepharose-Matrix, sodass sich dieses System ideal zur Reinigung spezifischer RNA bindender Proteine eignet. Darüber hinaus erlaubt diese von Hartmut et al. etablierte Methode eine native Elution der gebundenen Faktoren durch einen Überschuss an Tobramycin (Hartmuth, Urlaub et al. 2002).

##### *Kopplung der Säule mit RNA*

Zunächst wurden 200 µl N-hydroxy-succinimid-Matrix (NHS-Matrix) 10x mit je 1ml kalter 1mM HCl und anschließend 10x mit je 1ml kaltem C-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 0,01 µmol Tobramycin in 250µl C-Puffer für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Überkopfrotator an der Matrix derivatisiert. Zum Blocken freier Bindungsstellen der Matrix, wurde diese 5x mit je 1ml C-Puffer, 5x mit je 1ml B-Puffer gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit 1ml B-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde in 5 maliger Wiederholung 3x mit je 1ml W2-Puffer und 3x mit je 1ml W1-Puffer gewaschen, um unspezifische Bindungen in einem pH-Bereich von 4 – 9 zu entfernen. Anschließend wurde die Säule 10 x mit je 1ml Rando-Puffer äquilibriert.

Die zu untersuchende RNA (s.u.) wurde als Fusionskonstrukt mit dem Tobramycin RNA-Aptamers transkribiert und durch denaturierende PAGE gereinigt. Je 250 µg RNA wurden in 500 µl Rando-Puffer aufgenommen, bei 65°C für 5 min denaturiert, bei Raumtemperatur renaturiert und für 2 h bei 4 °C mit der vorbereiteten Matrix auf dem Überkopfrotator inkubiert. Um ungebundene RNA zu entfernen wurde die Säule im Anschluss 5 mal mit je 1ml Rando-Puffer gewaschen.

wtTOP S16 Oligo 5'-CCUUUCCGGUCGCGGCGCUGCGGUGUGG-3'

mutTOP Oligo 5'-GAGUGACCGGUCGCGGCGCUGCGGUGUGG-3'

### *Proteinbindung und Elution von der Tobra-Säule*

Die mit RNA beladene Tobra-Säule wurde mit ca. 10ml Gesamtzellextrakt aus HeLa-Zellen in 1ml-Aliquots geladen. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde jeweils 5 mal mit je 1ml Rando-Puffer, R-220, R-300 und R-350 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden gebundene Faktoren 2x mit 500 µl 10 mM Tobramycin in Rando-Puffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung, bzw. für eine anschließende Massenspektrometrie durch Silberfärbung analysiert (Shevchenko, Wilm et al. 1996).

#### **4.2.10 Dichtegradientenzentrifugation**

Eine relative Bestimmung der Größe von Proteinkomplexen aus HeLa-Kernextrakten erfolgte mittels Glyzeringradientenzentrifugation. Hierzu wurde mithilfe eines Gradient Master (Biocomp, Fredericton, NB, Kanada) nach Herstellerangabe ein linearer Gradient zwischen einer 10% und 40% Glyzerinstammlösung in G-Puffer und einem Volumen von 4 ml erstellt. Der Gradient wurde bei 4 °C für 1 h gekühlt und anschließend mit 200 µl filtriertem HeLa-Extrakt (vgl. 4.2.6.1) beladen. Nach einer Zentrifugation von 16h bei 40000 rpm in einem SW60Ti-Rotor (Beckman) wurden Fraktionen zu je 460 µl abgenommen und jeweils 100 µl mit 10 % Trichloressigsäure auf Eis gefällt, mit 10x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. 200 µl der Fraktion wurden zur Analyse der enthaltenen RNAs mit Phenol versetzt, aufgereinigt, im denaturierenden RNA-PAGE aufgetrennt und mittels Northern-Blot detektiert.

#### **4.2.11 Chromatographische Analyse von Zellextrakten - Gelfiltration**

Für die Fraktionierung von zytosolischem HeLa-Zellextrakt mittels Gelfiltration kamen vorgepackte Säulen (GE Healthcare) auf einem FPLC/HPLC-Äktapurifizier-System zur Verwendung. Alle eingesetzten Lösungen wurden zuvor steril filtriert und entgast. Zunächst wurde die Säule (Superdex 200 16/60) mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 1,5 Säulenvolumina PBS mit 0,01 % NP40 äquilibriert. Ein wie unter 4.2.1.2 beschrieben hergestellter HeLa-Zellextrakt wurde in einem

Volumen von 5 ml auf die Säule geladen und in einer isokarischen Elution über 1,5 Säulenvolumina und einem Elutionsvolumen von je 2 ml fraktioniert. 1 ml der Fraktion wurde anschließend mit 10% TCA auf Eis präzipitiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Eine Bestimmung der molekularen Größen der einzelnen Komplexe erfolgte anhand eines Säulenlaufes einer Mischung bekannter Proteine verschiedener Größe. 200 µl der Fraktion wurden mit Phenol extrahiert und die präzipitierten RNAs mittels RT-PCR detektiert. Zur Lagerung der Säule wurde diese mit 1,5 Säulenvolumina 1,5 M NaCl gewaschen und in 20 % EtOH gelagert.

#### **4.2.12      *Konzentrieren von Proteinlösungen durch Fällung mit Trichloressigsäure***

Zur Analyse von Proteinen in verdünnten Lösungen können diese mittels der stark denaturierend wirkenden Trichloressigsäure ausgefällt werden. Hierzu wurde die Proteinlösung mit 0,1 Vol. (100 %) Trichloressigsäure versetzt und 30 min bis 12 h auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde sedimentiert (18000 g, 4 °C, 30 min) und nach Abnahme des Überstandes mit 1 ml TCA-Waschpuffer versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (18000 g, 4 °C, 30 min) wurde das Pellet bei noch unzureichender Neutralisation der Trichloressigsäure erneut gewaschen. Anschließend wurde das Proteinpräzipitat im Vakuum getrocknet, in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 10- 15 min unter Schütteln gelöst und nach Denaturierung der Probe für 5 min bei 95 °C mittels SDS-PAGE analysiert.

### **4.3 Zellkulturmethoden**

#### **4.3.1 *Kultivierung von Säugerzellen***

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Säugerzelllinien (HeLa-, TZMbl-, 293-Zellen, SMA-Typ-I-Fibroblasten) wurden in Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM, PAA, Linz) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen (Ø10 cm, Falcon) oder Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Gibco) kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS, Gibco BRL) und wurde alle zwei Tage gewechselt. Vor Erreichen von 100 % Konfluenz wurden

die Zellen passagiert. Dazu wurden sie zunächst mit PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 1% Trypsin in PBS (pH 7,4) von der Kulturschale abgelöst und in einer 1:10 Verdünnung auf neuen Kulturschalen ausgesät.

#### **4.3.2 Bestimmung der Zelldichte**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10  $\mu$ l einer verdünnten Zellsuspension auf beide Seiten eines Hämazytometers (Neubauer) gegeben. Durch das aufgebrachte Deckgläschen kommen die Zellen in einer einzelligen Schicht zu liegen und können in den Feldern der Kammer ausgezählt werden. Aus statistischen Gründen wurden mindestens sechs Felder ausgezählt. Die Zellzahl je ml Lösung ergibt sich infolge der Division des erhaltenen Wertes durch die Anzahl der gezählten Felder, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und einem Kammer-spezifischen Faktor von  $10^4$ .

#### **4.3.3 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen**

Die Zellen wurden aus einer logarhythmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden entweder Suspensionszellen abgenommen oder adhärente Zellen mit Trypsin behandelt, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert (300 g, 5 min) und in Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in ein Einfrierröhrchen aliquotiert, langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  (möglichst  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) abgekühlt und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad. 1 ml der aufgetauten Zellsuspension wurde mit 50 ml Standardmedium verdünnt, und in einer Zellkulturflasche weiterkultiviert.

#### **4.3.4 DRB-Behandlung von HeLa-Zellen**

Das Nukleotidanalogen 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) wirkt als potenter Inhibitor der Cdk9 Kinaseaktivität und blockiert so die PolII abhängige Transkription (Sehgal, Darnell et al. 1976). Parallel dazu führt eine Behandlung mit DRB durch einen noch unbekanntem Feedbackmechanismus auch zu einer Auflösung des 7SK RNP, welche den Verlust der P-TEFb Aktivität kompensiert.

Um eine Trennung des 7SK RNP in vivo zu ermöglichen wurden daher Zellen 1h vor der Extraktpräparation zweimal mit PBS gewaschen und in DMEM mit 100  $\mu$ M DRB inkubiert. Die Extrakte wurden unmittelbar danach wie unter 4.2.6.3 beschrieben hergestellt.

### **4.3.5 Transfektionstechniken**

#### **4.3.5.1 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen**

Zur Expression Ha- bzw. FLAG- markierter Proteine in Säugerzellen wurden diese 24 h vor der eigentlichen Transfektion in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen je Schale in  $\varnothing 35$  mm Schalen ausgesät. 2-4 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die Transfektion erfolgte in der Regel mittels Nanofectin (PAA, Linz), bei Erfordernis höherer Extraktmengen mittels  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Zur Transfektion mit Nanofectin wurden je Ansatz 3  $\mu$ g DNA mit 100  $\mu$ l NaCl (150 mM) nach Herstellerangaben gemischt und kurz inkubiert. Parallel wurden 9.6  $\mu$ l Nanofectin mit 100  $\mu$ l NaCl (150 mM) gemischt und anschließend zur DANN-Lösung gegeben. Nach 25 min Inkubation wurde diese Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Diese konnten nach 24-48 h im Kulturschrank zur Extraktpräparation oder immunohistochemischen Analyse entnommen werden.

#### **4.3.5.2 Reduktion der SMN-Expression durch RNA-Interferenz**

In Säugerzellen lässt sich die Expression einzelner Gene mit Hilfe der RNA Interferenz-Technik gezielt unterdrücken. Hierbei wird die Degradation spezifischer mRNAs durch kleine komplementäre RNAs (siRNAs) vermittelt (Elbashir, Harborth et al. 2001). Diese Strategie erlaubt es vielen Eukaryonten fremde doppelsträngige RNAs als zelluläres Abwehrsystem gegen die jeweiligen Pathogene zu nutzen. Diese kurzen RNA Fragmente werden dabei in den RISC (RNA induced silencing complex) inkorporiert und entwunden, wobei einer der beiden Stränge selektiv die zu ihm komplementäre mRNA bindet. Diese wird anschließend durch die RISC eigene Endonuklease Ago2 abgebaut. HeLa-Zellen wurden je nach Bedarf in  $\varnothing 35$  mm Kammerplatten oder Schalen ausgesät. Die Transfektionen erfolgten bei einer Konfluenz von etwa 30%. Dazu wurden die beiden Lösungen A und Lösung B steril angesetzt und für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

## Lösung A:

10 µl siRNA-Duplex, 20µM  
175 µl OPTI-MEM

## Lösung B:

4 µl Oligofectamin  
11 µl OPTI-MEM

Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den HeLa-Zellen abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 800 µl OPTI-MEM ohne FCS und Antibiotika bedeckt. Schließlich wurde die Transfektionslösung vorsichtig zu den Zellen gegeben und die Zellen weiterkultiviert. Nach 4 Stunden wurden 500 µl OPTI-MEM mit 30 % FCS zugegeben. Nach 2 oder 3 Tagen konnten die Zellen mittels eines Zellschabers oder durch Trypsinierung geerntet werden. Der Erfolg der RNA-Interferenz wurde mittels Immunoblot überprüft.

#### 4.3.6 *Luziferase basierende Reporterstudien*

Reporteranalysen eignen sich zur Untersuchung der Genexpression gleichermaßen wie zur Bestimmung von Promotoraktivitäten, intrazellulären Signaltransduktionswegen oder Protein-Protein Wechselwirkungen (Alam and Cook 1990). Dabei findet aufgrund folgender positiver Eigenschaften eine aus der amerikanischen Feuerfliege *P. pyralis* isolierte Luziferase häufig Verwendung in Säugerzellen: Die Methode ist leicht zu quantifizieren, schnell anwendbar und äußerst sensitiv, da unter optimalen Bedingungen noch bis zu  $\sim 1 \times 10^{-20}$  mol Luziferase detektierbar sind (Bronstein, Fortin et al. 1994).

Zur luminometrischen Analyse RNAi behandelte bzw. transfizierte TZMbl-Zellen wurden diese nach 2 maligem Waschen mit PBS mit jeweils 200 µl Lysepuffer versetzt. 20 µl der wie unter 4.2.6.3 beschrieben gewonnenen Zellextrakte wurden anschließend in eine 96-Kammerplatte überführt. Parallel hierzu wurden je Messung 140 µl Luziferasepuffer mit 10 µl Luziferinlösung versetzt, wobei je 100 µl der

## Methoden

---

Lösung durch den Injektor hinzugefügt wurden. Die Messung der Lichtintensität je Kammer erfolgt im Abstand von 2 Sekunden und einer Dauer von fünf bzw. einer Sekunde. Die Experimente wurden zur Validierung der erhaltenen Daten zweifach wiederholt.

Luziferasepuffer	25 mM	Glyzyl-Glyzin
	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	15 mM	MgSO <sub>4</sub>
	4 mM	EGTA
kurz vor Gebrauch:	1 mM	DTT
	1 mM	ATP
	pH 7,9	
Luziferinlösung	1,5 µg/µl	Luziferin
	25 mM	Glyzyl-Glyzin
	pH 7,0	

## 5 Ergebnisse

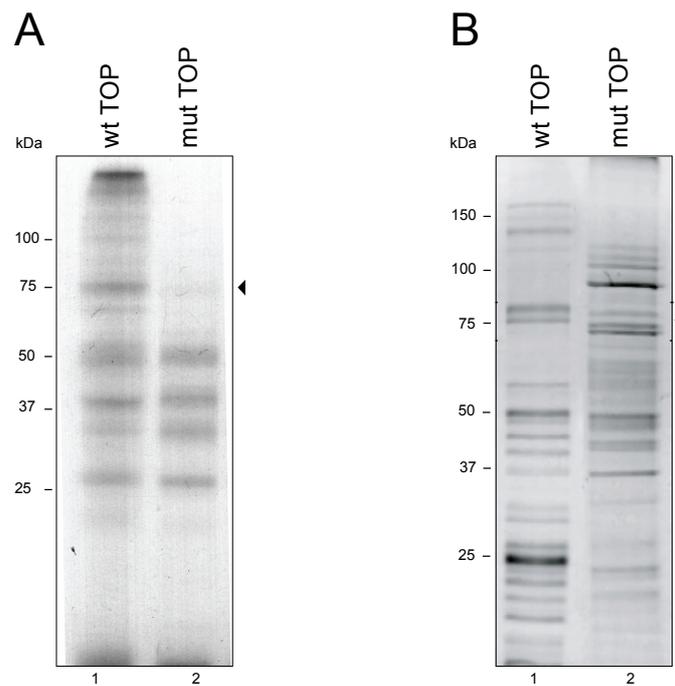
Die Genexpression in höheren Eukaryoten wird hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene kontrolliert. Demgegenüber erfolgt die Regulation derjenigen Gene, welche für ribosomale Proteine bzw. Translationselongationsfaktoren kodieren spezifisch auf der Ebene der Translation (Hamilton, Stoneley et al. 2006). Interessanterweise zeichnen sich mRNAs ribosomaler Proteine durch die Präsenz eines unkonventionellen 5' terminalen Oligopyrimidin reichen Motivs (5'TOP-Motiv) aus (Cardinali, Carissimi et al. 2003). Daten von Biberman et al. legen nahe, dass dieses Motiv in nicht proliferierenden Zellen einen unbekanntem Faktor rekrutiert, welcher die Translation der jeweiligen RNA selektiv reprimiert. (Levy, Avni et al. 1991; Biberman and Meyuhas 1999). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand daher zunächst die Identifikation von Proteinen im Vordergrund, die diese 5'TOP Sequenzen binden. Im Zuge dessen konnte das La ähnliche Protein 7 (LARP7) als Oligopyrimidin bindender Faktor identifiziert werden. Obwohl eine Interaktion von LARP7 mit TOP-mRNAs *in vitro* nachgewiesen werden konnte, bindet dieses Protein *in vivo* jedoch hauptsächlich an 7SK RNA. Ferner fungiert LARP7 als Bindeglied zwischen 7SK RNA und den 7SK RNP Komponenten Cdk9 und HEXIM1 und reguliert so maßgeblich die Aktivität des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb.

### 5.1 Identifikation eines Oligopyrimidin bindenden Proteins *in vitro*

#### 5.1.1 LARP7 assoziiert mit Urdin-reicher RNA

Ein gemeinsames Merkmal von TOP-mRNAs ist deren überdurchschnittlich hoher Pyrimidinanteil von 4-14 Aminosäuren unmittelbar nach der Capstruktur (Meyuhas 2000). Um mit dieser Struktur spezifisch interagierende Proteine zu identifizieren wurden UV-Quervernetzungsexperimente (Crosslink) mit dem isolierten TOP-Motiv der exemplarisch gewählten ribosomalen S16 mRNA durchgeführt. Hierzu wurden entsprechende [<sup>32</sup>P]-markierte Oligonukleotide der S16 Wildtypsequenz (wt TOP) bzw. einer

mutagenisierten Variante (mut TOP) in HeLa-Zellextrakt inkubiert und UV bestrahlt. RNA assoziierte Faktoren wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie visualisiert. Im Gegensatz zur Kontrollsequenz konnte dabei ein prominenter Crosslink eines ca. 75 kDa Proteins an die wildtypische S16 TOP-mRNA-Sequenz nachgewiesen werden (Abb. 9 A). Das als TOP-mRNA bindend hinlänglich bekannte La Protein schien jedoch aufgrund der Größe des Crosslinks als potentieller Kandidat unwahrscheinlich. Daher sollte der unbekannte Faktor mithilfe einer Tobramycin Affinitätschromatographie weiter gereinigt und identifiziert werden. Diese erstmals von Harthmuth *et al.* beschriebene Methode zur Reinigung funktioneller RNPs unter nativen Bedingungen, basiert auf der selektiven Interaktion eines RNA-Aptamers mit dem Aminoglykosidantibiotikum Tobramycin (Harthmuth, Urlaub et al. 2002).

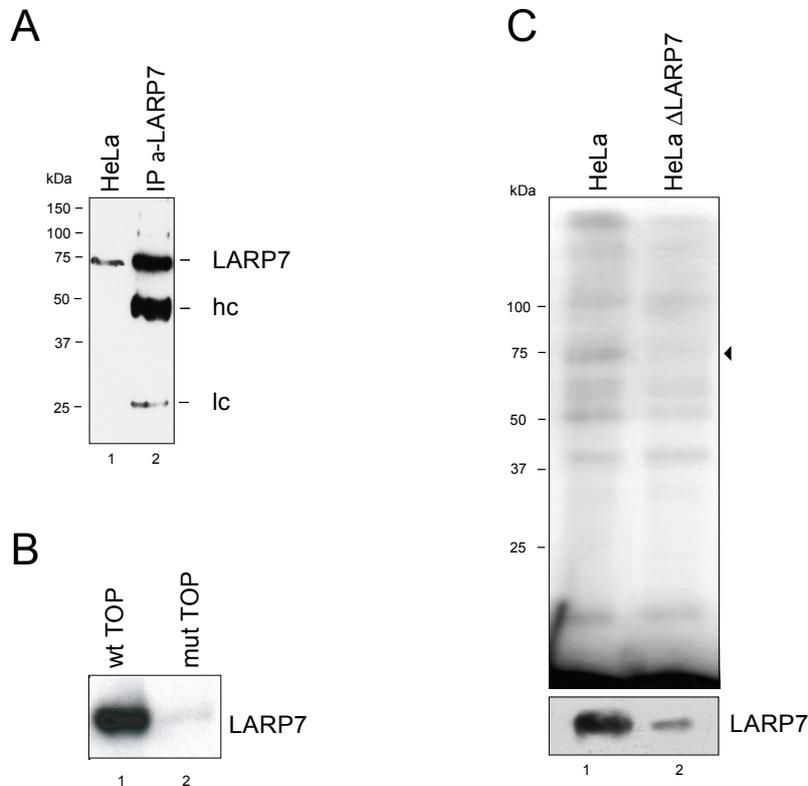


**Abbildung 9: Identifikation und Aufreinigung eines in vitro 5'-TOP-Motiv bindenden Faktors**

(A) UV-Crosslink einer [<sup>32</sup>P] markierten wildtypischen (Spur 1) bzw. mutierten (Spur2) 5'-TOP Sequenz (Sequenzdetails siehe Material und Methoden) in HeLa-Zellextrakt. Die Pfeilspitze markiert ein spezifisch an die wildtypische RNA gecrosslinktes Protein bei 75 kDa. (B) SDS-PAGE eines nach Tobramycinaffinitätsreinigung mittels wildtypischer (Spur1) oder mutanter (Spur2) 5'-TOP-Sequenz gewonnenen Eluats. Ein ausschließlich in der wildtypischen 5'-TOP Aufreinigung erkennbares Protein bei 75 kDa ist durch eine Pfeilspitze markiert.

Infolgedessen wurden zwei RNA Transkripte generiert, bestehend aus einer Fusion des Tobramycin RNA-Aptamers mit der wildtypischen bzw. mutierten S16 TOP-mRNA-Sequenz. Beide RNAs wurden auf eine mit Tobramycin derivatisierte NHS-Sepharosematrix geladen und im Anschluss zur Affinitätsreinigung von HeLa-Gesamtzellextrakt eingesetzt. Gebundene Proteine wurden durch einen Überschuss an Tobramycin eluiert und im Coomassie Blue gefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Hier zeigte sich analog zu den im Crosslink erhaltenen Daten neben einigen unspezifischen, auch in der Kontrolle erkennbaren, Banden eine ausschließlich in der Wildtyp-Aufreinigung auftretende Bande zwischen 70 und 80 kDa (Abb. 9 B). Die anschließende massenspektrometrische Analyse dieses Bereichs lieferte das zuvor als HDCMA18p bekannte La ähnliche Protein 7 (LARP7). In diesem Zusammenhang konnte anhand der erhaltenen LARP7 Peptide eine bis dato nicht annotierte Extension des N-Terminus um 7 Aminosäuren detektiert werden, deren tatsächliche Existenz mittels 5'-RACE bestätigt wurde (nicht gezeigt - *accession number*: EU667388). Um die Präsenz dieses Faktors in den erhaltenen Tobramycin-Elutionsfraktionen weiter zu bestätigen, wurde nach Klonierung und Expression von LARP7 ein polyklonales Antiserum generiert und anschließend affinitätsgereinigt. Eine Spezifitätsbestimmung des so gewonnenen Antikörpers erfolgte mittels Immunpräzipitation aus HeLa-Zellextrakt (Abb. 10 A, Spur 2), sowie im Immunoblot (Spur 1). Neben der schweren (50 kDa) und der leichten (25 kDa) Immunglobulinkette ließ sich dabei eine einzige 75 kDa Bande entsprechend der Größe von LARP7 erkennen. Ebenso zeigte sich in der Tobramycinaufreinigung der wildtypischen S16 TOP-Motiv Elution, jedoch nicht in der der Mutante eine vergleichbare Bande für LARP7, was dessen spezifische Assoziation mit der Zielsequenz *in vitro* zeigt (Abb. 10 B). Darüberhinaus konnte eine Oligopyrimidinbindung von LARP7 auch in UV-Quervernetzungsexperimenten klar nachgewiesen werden. Hierzu wurde HeLa-Zellextrakt selektiv LARP7 immundepletiert, mit dem wildtypischen [<sup>32</sup>P]-markierten S16 TOP-Motiv inkubiert und UV bestrahlt. Wie aus Abbildung 10 C zu ersehen, führt die Depletion von LARP7 (untere Teilabb.) im Gegensatz zum Kontrolleextrakt zu einem

Verlust des Signals bei 75 kDa nach Crosslink und Auftrennung im SDS-PAGE.



**Abbildung 10: LARP7 bindet U-reiche RNA**

(A) Charakterisierung eines anti-LARP7 Antikörpers mittels Immunpräzipitation (Spur2) und Immunoblot von HeLa-Zellextrakt (Spur1). hc bezeichnet die schwere, lc die leichte Kette des Antikörpers. (B) anti-LARP7 Immunoblot einer wildtypischen (Spur 1) bzw. mutanten (Spur2) 5'-TOP Tobramycinelution. LARP7 assoziiert spezifisch mit der wildtypischen, nicht mit der mutierten, 5'-TOP-Sequenz. (C) UV-Crosslink einer [32P] markierten wildtypischen 5'-TOP Sequenz in unbehandeltem (Spur1) und LARP7 depletiertem (Spur2) HeLa-Zellextrakt. Nach Depletion von LARP7 (untere Teilabb.) zeigt sich ein Verlust der in unbehandeltem Zellextrakt auftretenden Bande bei 75 kDa (Pfeilspitze).

### 5.1.2 Das La ähnliche Protein LARP7 ist in Vertebraten hoch konserviert

Das LARP7 Gen kodiert eine N-terminale La-Domäne gefolgt von zwei RNA bindenden Motiven (RRM) und zählt daher zur Familie der La ähnlichen Proteine (LARP) (Wolin and Cedervall 2002) (Abb. 11A ).

A

MIPNIEGMET ESGNQEKVME EESTEKKKEV EKKKRSRVKQ VLADIAKQVD FWFGDANLHK DRFLREQIEK  
 SRDGYVDISL LVSFNKMKKL TTDGKLIARA LRSSAVVELD LEGTRIRRK PLGERPKDED ERTVYVELLP  
 KNVNHSWIER VFGKCGNVVY ISIPHYKSTG DPKGFVFEV ETKEQAAKAI EFLNNPPEEA PRKPGIFPKT  
 VKNKPIPALR VVEEKKKKKK KGRMKKEDN IQAKEENMDT SNTSISKMKR SRPTSEGSDI ESTEPQKQCS  
 KKKKKRDRVE ASSLEPVRTG KRKRSSEDA ESLAPRSVKV KIIQKDIKE ASEASKENRD IEISTEBEED  
 TGDLKDSSL KTKRKHKKKH KERHKMGEEV IPLRVLSKSE WMDLKKEYLA LQKASMALK KTISQIKSES  
 EMETDSGVPQ NTGMKNEKTA NREECRTQEK VNATGPQFVS GVIVKIISTE PLPGRKQVRD TLAAISEVLY  
 VDLLEGDTEC HARFKTPEDA QAVINAYTEI NKKHCWKLEI LSGDHEQRYW QKILVDRQAK LNQPREEKRG  
 TEKLITKAEK IRLAKTQQAS KHIRFSEYD



B

Gen		Identität (%)	
Spezies	Symbol	Protein	DNA
<i>Homo sapiens</i>	LARP7		
<i>Pan troglodytes</i>	LARP7	99.3	99.4
<i>Canis lupus familiaris</i>	LARP7	86.7	86.7
<i>Bos taurus</i>	LARP7	90.2	90.8
<i>Mus musculus</i>	Larp7	82.9	81.5
<i>Rattus norvegicus</i>	Larp7l	89.5	86.0
<i>Gallus gallus</i>	LARP7	75.0	74.3
<i>Danio rerio</i>	zgc:56476	58.7	59.4
<i>Drosophila melanogaster</i>	mxc	33.9	44.0
<i>Anopheles gambiae</i>	AgaP_AGAP008164	32.5	43.5

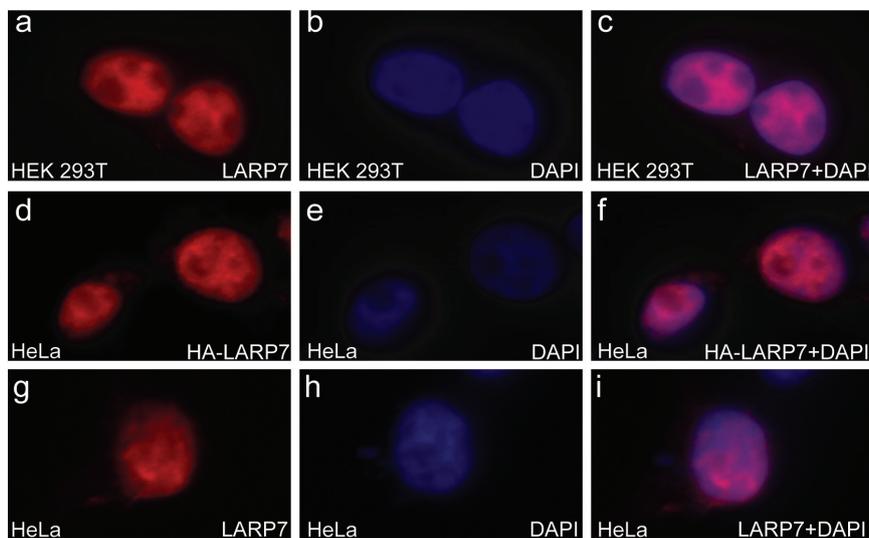
#### Abbildung 11: Schematische Darstellung der konservierten Domänen von LARP7

(A) LARP7 cDNA; konservierte Domänen sind farbig unterlegt; La-Domäne: orange, RRM: gelb.  
 (B) Identitätsvergleich der in Vertebraten und einigen Dipteren identifizierten LARP7 Homologe.

Auf evolutiver Ebene ist LARP7 in Vertebraten hoch konserviert, jedoch scheinen entsprechende Orthologe in niederen Eukaryoten zu fehlen (Abb. 11 B). Unter allen bekannten LARPs weist dieses bislang uncharakterisierte Protein den höchsten Homologiegrad zum Gründungsmitglied der Familie, dem humanen La Protein (LARP3), auf. Interessanterweise bindet auch La nachweislich Uridin-reiche Transkripte, wofür im Wesentlichen dessen La-Domäne zusammen mit der ersten RRM verantwortlich gemacht werden (Teplova, Yuan et al. 2006). Insgesamt präsentiert sich LARP7 somit anhand seiner durch Crosslink und Affinitätsreinigung demonstrierten Präferenz für Pyrimidin-reiche RNA als ein *in vitro* TOP-Motiv bindender Faktor.

## 5.2 Die zelluläre Lokalisation von LARP7

LARP7 bindet *in vitro* an Uridin-reiche RNA. Im Fall einer funktionellen Interaktion sollte daher die Bindung von LARP7 an 5´TOP-Sequenzen auch *in vivo* erkennbar sein. Infolgedessen müsste LARP7 als potentieller translationsregulierender Faktor von TOP-mRNAs zumindest partiell mit diesen im Zytoplasma kolokalisieren. Um die Lokalisation von LARP7 auf Zellebene näher untersuchen zu können, wurde dessen subzelluläre Verteilung in zwei verschiedenen humanen Zelllinien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.



**Abbildung 12: LARP7 lokalisiert im Zellkern**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der LARP7 Verteilung in nicht transfizierten HEK 293T, HeLa und HA-LARP7 transfizierten HeLa-Zellen. Ein Vergleich des 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (b, e, f) und des mittels monospezifischen anti-HA (d) bzw. antiLARP7 (a, g) Antikörpern visualisierten LARP7 Signals zeigt eine, Zelltyp unabhängige, nukleäre Lokalisation des endogenen, wie auch überexprimierten Proteins (c, f, i).

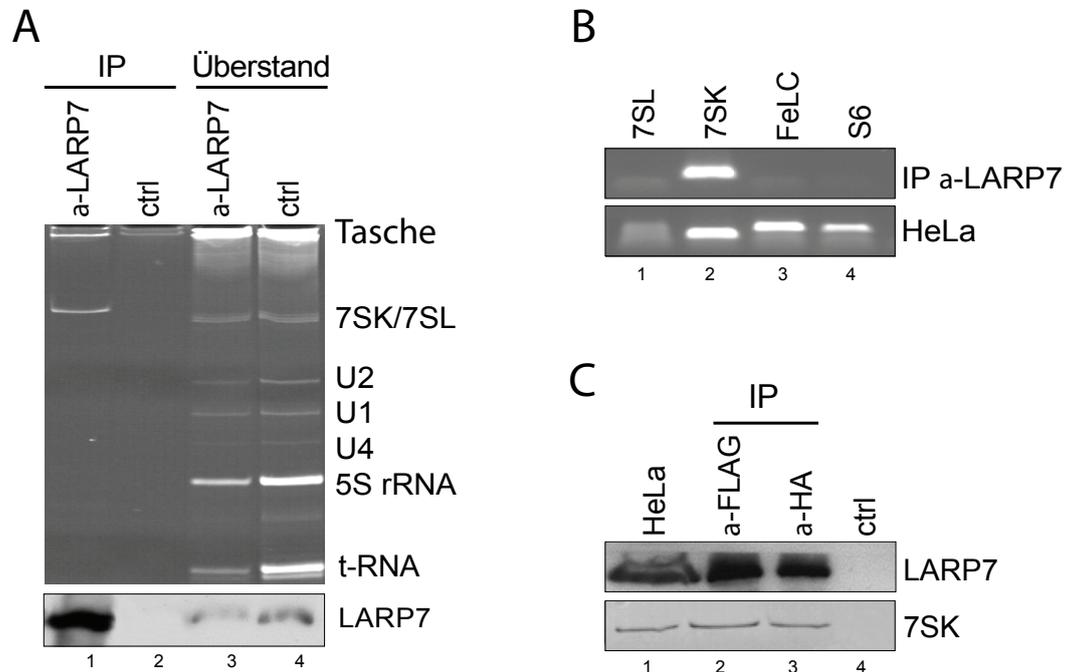
Erstaunlicherweise lokalisiert endogenes, wie auch überexprimiertes, HA-markiertes LARP7 sowohl in HeLa- als auch in HEK 293T- Zellen ausschließlich im Zellkern (Abb. 12 c, f, i). Die Verteilung innerhalb des Kerns erscheint dabei diffus, wobei die Nukleoli ausgespart bleiben. Da auch in unterschiedlichen Zellstadien keine zytoplasmatische Lokalisation zu erkennen war, erscheint, trotz einer Bindung an TOP-Sequenzen *in vitro*, eine primäre Rolle von LARP7 in der TOP-mRNA Translation zweifelhaft.

### 5.3 LARP7 assoziiert spezifisch mit 7SK RNA

Aufgrund der offensichtlichen Diskrepanz der nukleären Lokalisation von LARP7 auf der einen und der *in vitro* beobachteten Bindung an überwiegend zytoplasmatische TOP-mRNA Sequenzen auf der anderen Seite, stellte sich daher die Frage nach den tatsächlich LARP7 assoziierten RNAs. Um diese RNAs direkt identifizieren zu können, wurden Ko-Immunpräzipitationsstudien mit anti-LARP7 Antikörpern aus HeLa-Kernextrakt durchgeführt. Wie in Abbildung 13 A (untere Teilabb.) erkennbar, konnte LARP7 mit dem spezifischen Antikörper nicht jedoch mit einem unspezifischen Kontrollantikörper effizient präzipitiert werden. Nach Phenol-Chloroform Extraktion der wässrigen Phase der Immunpräzipitationen (IP) und der zugehörigen Überstände wurden kopräzipitierte RNAs durch denaturierende RNA-PAGE analysiert. Die Ethidiumbromid-Färbung des Gels zeigte hierbei in der anti-LARP7 IP neben einigen hochmolekularen RNAs eine definierte Bande von ca. 330 Nukleotiden (Spur1). Da die Größe der mit LARP7 kopräzipitierten RNA im Vergleich mit den aus den jeweiligen Überständen gewonnenen RNAs darauf hindeutete, dass es sich entweder um die zytoplasmatische 7SL oder die nukleäre 7SK RNA handelte, sollte diese Hypothese mittels reverser Transkription und Klonierung bzw. Sequenzierung der RNA bestätigt werden. Hierzu wurde die entsprechende Bande aus dem Gel eluiert und mit spezifischen Oligonukleotiden (Primer) für 7SL, 7SK, die RNA der leichten Kette von Ferritin (FeLC) und die ribosomale S6 TOP-mRNA amplifiziert. Während alle Oligonukleotidpaare die jeweilige RNA aus Gesamtzell-RNA amplifizierten, wurde die mit LARP7 kopräzipitierte RNA hingegen nur durch die 7SK spezifischen Primer amplifiziert (Abb. 13 B). Darüberhinaus konnte diese RNA nach Klonierung und Sequenzierung eindeutig als 7SK RNA identifiziert werden (nicht gezeigt).

LARP7 kopräzipitiert zusätzlich einige höhermolekulare, potentielle TOP-mRNAs, welche jedoch in Anbetracht ihrer wesentlich geringeren Abundanz und ihres prinzipiell zytoplasmatischen Vorkommens gegenüber 7SK RNA in den Hintergrund treten. Daher sollte die Spezifität der beobachteten LARP7 / 7SK RNA Interaktion durch Transfektionsstudien weiter untermauert werden, um so eine

potentielle Kreuzreaktion des LARP7 Antikörpers ausschließen zu können.



**Abbildung 13: LARP7 präzipitiert spezifisch 7SK RNA.**

(A) Immunpräzipitationen aus HeLa-Kernextrakt mit anti-LARP7 (Spur1) oder Kontroll-Antikörpern (Spur2) und deren Überstände (Spuren 3 und 4). Die Ethidiumbromidfärbung der im denaturierenden RNA-Gel aufgetrennten, kopräzipitierten RNAs lässt eine spezifisch mit LARP7 assoziierte RNA von ca. 330 Nukleotiden Länge erkennen. Die untere Teilabbildung zeigt eine anti LARP7 Immunoblotanalyse der Immunpräzipitationen (Spuren 1 und 2) und deren Überstände (Spuren 3 und 4). (B) 7SK RNA Nachweis in Immunpräzipitaten von LARP7. Die Analyse der in Abbildung 13 A identifizierten 330 Nukleotiden langen RNA mittels reverser Transkription mit 7SL (Spur 1), 7SK (Spur 2), FeLC (Spur 3) oder S6 (Spur 4) spezifischen Primerpaaren (obere Teilabb.) amplifiziert ausschliesslich 7SK RNA. Eine Amplifikation der jeweiligen RNAs aus HeLa-Zellextrakt ist in der unteren Teilabbildung dargestellt. (C) anti-HA (Spur 3), anti-FLAG (Spur 3) Immunpräzipitationen aus FLAG-HA-LARP7 transfizierten HeLa-Zellen präzipitieren 7SK RNA (untere Teilabb.). Spur 1 repräsentiert 10% des eingesetzten HeLa-Zellextrakts, Spur 4 eine Kontroll-Immunpräzipitation mit einem unspezifischen Serum.

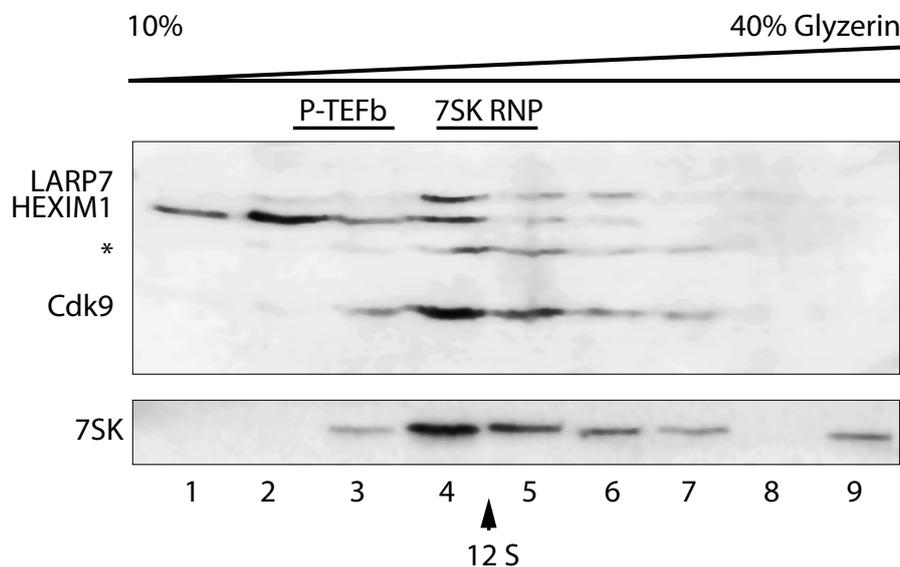
Immunpräzipitationen aus FLAG-HA-LARP7 transfiziertem HeLa-Extrakt bestätigten dabei die zuvor gewonnenen Resultate. LARP7 kopräzipitiert sowohl in Immunpräzipitationen mit anti-FLAG wie auch anti-HA Antikörpern spezifisch 7SK RNA (Abb. 13 C). Diese Daten lassen somit den unmittelbaren Schluss zu, dass LARP7 einen neuen 7SK RNA assoziierten Faktor darstellt.

## 5.4 LARP7 ist ein integraler Bestandteil des 7SK RNP

Die einzige bislang bekannte Funktion der 7SK RNA ist deren negative Regulation der RNA PolII Transkription. 7SK RNA bindet dabei an HEXIM1 und reprimiert daraufhin die Elongation der Transkription durch P-TEFb. Infolgedessen lag die Vermutung nahe, dass auch LARP7 als exklusiv nukleärer, 7SK RNA bindender Faktor Einfluss auf die Transkription von PolII Klasse Genen nehmen könnte. Ziel der folgenden Experimente war daher zunächst die Klärung der Frage, ob LARP7 Teil eines der bekannten 7SK RNA Komplexe ist, welche die Transkriptionselongation durch P-TEFb kontrollieren.

### 5.4.1 LARP7 kofraktioniert mit Komponenten des 7SK RNP

Humane 7SK RNA sedimentiert im Dichtegradienten von HeLa-Extrakten innerhalb eines 12 S großen 7SK RNP (Nguyen, Kiss et al. 2001). Um das Sedimentationsverhalten von LARP7 in Relation zu 7SK RNA untersuchen zu können, sollte dessen Verteilung analog zu den von Nguyen et al. durchgeführten Studien in einem 10% - 40% Glyzeringradienten analysiert werden.



**Abbildung 14: LARP7 kosedimentiert mit 7SK RNA, Cdk9 und HEXIM1.**

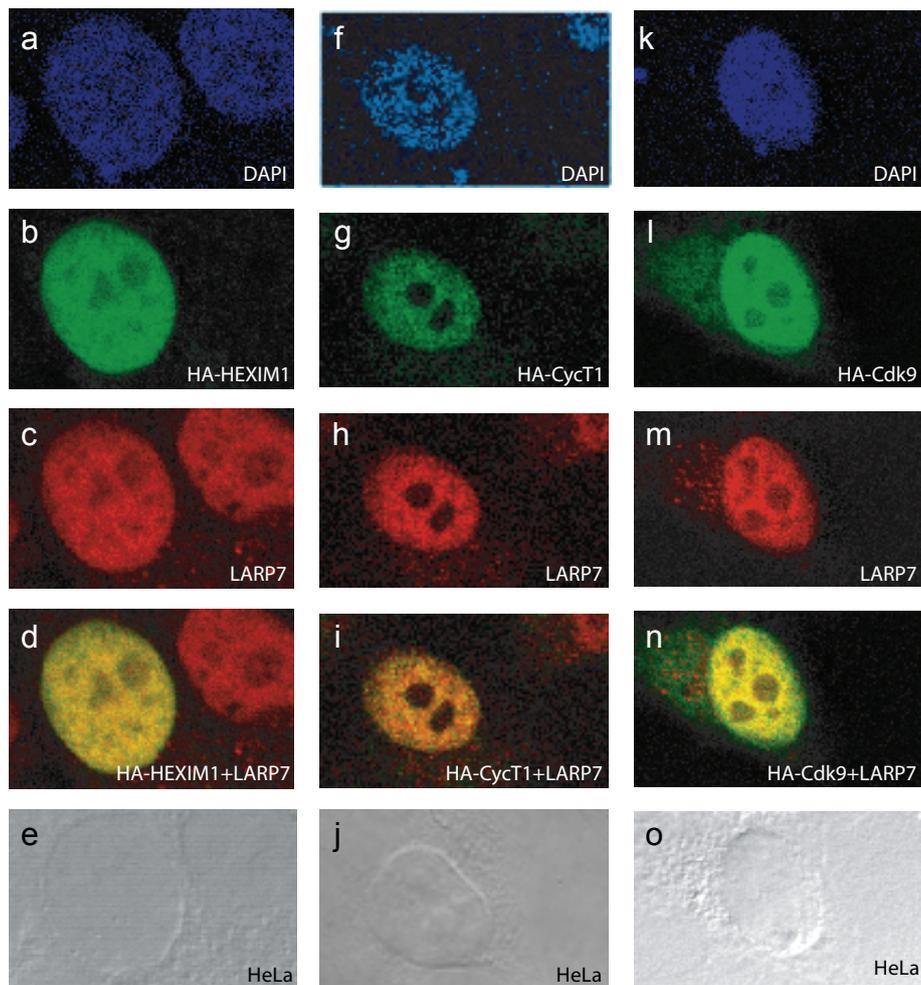
Anti-LARP7, anti-HEXIM1 und anti-Cdk9 Immuno- (obere Teilabb.) und 7SK Northern-Blot-Analyse (obere Teilabb.) eines im 10-40% Glyzeringradienten fraktionierten HeLa-Zellextraktes. LARP7 und Cdk9 akkumulieren zusammen mit 7SK RNA in Fraktion 4 und 5. HEXIM1 sedimentiert hauptsächlich in den niedermolekularen Fraktionen 2 und 3 und partiell in Fraktion 4. Eine ungespezifische Bande ist durch einen Stern markiert.



Wie zuvor im Dichtegradienten beobachtet, konnten nach Immunoblot der Elutionsfraktionen zwei distinkte Cdk9 Komplexe entsprechend eines kalkulierten Molekulargewichts von 600 kDa (Fraktionen 3 und 4) und 250 kDa (Fraktionen 11 und 12) nachgewiesen werden. Reverse Transkription der aus den Gelfiltrationsfraktionen extrahierten RNA mit 7SK RNA spezifischen Primern ließ jedoch nur für den höhermolekularen Komplex eine 7SK RNA Interaktion erkennen. Anhand dessen präsentiert sich der kleinere 250 kDa Komplex als die aktive Form von P-TEFb, wohingegen der 600 kDa Komplex aller Voraussicht nach das 7SK RNP repräsentiert. Während das Elutionsmaximum von HEXIM1 bei ca. 500 kDa in Fraktion 6 lag und nur eine partielle Überlagerung mit 7SK RNA und Cdk9 aufwies, erschien LARP7, analog zu den Resultaten der Dichtegradientenzentrifugation, ausschließlich im 600 kDa Komplex zusammen mit 7SK RNA. Diese enge Assoziation von LARP7 mit 7SK RNA, die sowohl durch Dichtegradientenanalyse, als auch durch Gelfiltrationsstudien bestätigt werden konnte, argumentiert somit stark für LARP7 als eine neue Komponente des 7SK RNP.

#### **5.4.2 LARP7 kolokalisiert in proliferierenden HeLa-Zellen mit HEXIM1 und P-TEFb**

Die zuvor beschriebene Interaktion von 7SK RNA mit LARP7 und dessen Kosedimentation mit HEXIM1 und Cdk9 *in vitro*, warfen ferner die Frage auf, ob sich die LARP7 / 7SK RNP Assoziation auch *in vivo* rekapitulieren ließe. Hierzu wurde jeweils eine der bekannten 7SK RNP Komponenten als HA-Fusionsprotein in HeLa-Zellen transient überexprimiert und mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie auf eine mögliche Kolokalisation mit endogenem LARP7 hin untersucht. Wie in einem der optischen Schnitte der Aufnahme in Abbildung 16 zu erkennen ist, lokalisierten sowohl HA-HEXIM1, wie auch HA-CycT1 und HA-Cdk9 ausschließlich im Zellkern, wobei die Nukleoli ausgepart blieben (b, g, l). Analog zu den bereits lichtmikroskopisch erhaltenen Daten konnte auch für LARP7 eine homogene und auf das Nukleoplasma beschränkte Verteilung innerhalb der Fokusebene nachgewiesen werden (c, h, m).



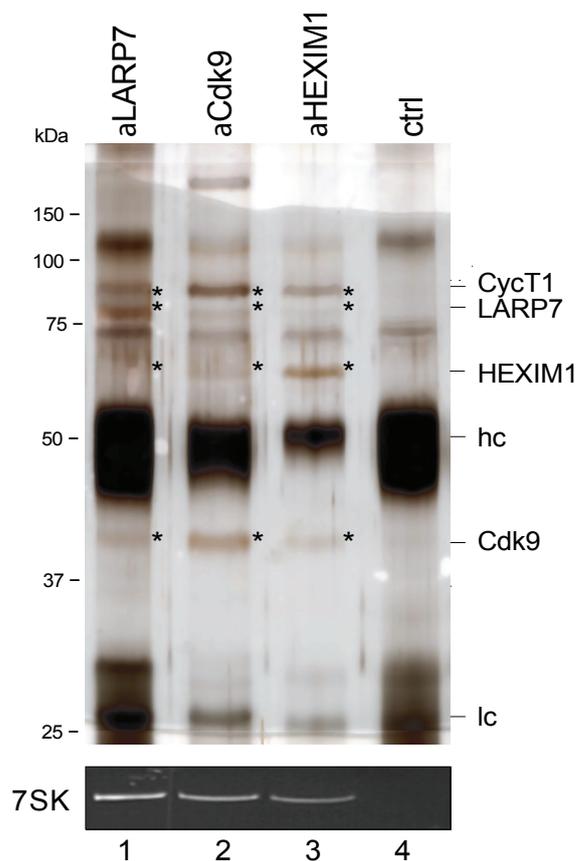
**Abbildung 16: LARP7 kolokalisiert mit HEXIM1 und Cdk9 im Zellkern.**

Ko-Immunfluoreszenzanalyse von HA-HEXIM1 (a-e), HA-Cyclin T1 (f-j) bzw. HA-Cdk9 (k-o) mit endogenem LARP7 mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie. Die Überlagerung des LARP7 Signals (c, h, m) mit dem jeweiligen Signal für HA-HEXIM1 (b), HA-Cyclin T1 (g) oder HA-Cdk9 (l) zeigt deren Kolokalisation mit LARP7 im Nukleoplasma (d, i, n). Die untere Reihe repräsentiert eine Durchlichtaufnahme der entsprechenden Zellen (e, j, o).

Erstaunlicherweise zeigte sich nach Überlagerung beider Signale eine annähernd vollständige Kolokalisation von LARP7 mit jedem der drei 7SK RNP Komponenten (d, i, n). Diese erschien lediglich im Fall von CycT1 etwas weniger stark ausgeprägt. Insgesamt legen die bislang erhaltenen Daten somit die Vermutung nahe, dass LARP7 *in vitro* wie auch *in vivo* als ein Bestandteil des regulatorischen 7K RNP vorliegt.

### 5.4.3 Massenspektrometrische Analyse des 7SK RNP

Eindeutig bestätigt werden sollte LARP7 als Bestandteil des 7SK RNP Komplexes mittels massenspektrometrischer Analyse von Ko-Immunpräzipitationen aus HeLa-Kernextrakt. Zu diesem Zweck wurden anti-LARP7, anti-Cdk9 und anti-HEXIM1 Immunpräzipitationen im SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung analysiert. Zudem wurde ein unspezifisches Serum als Kontrolle eingesetzt. Die Effizienz der jeweiligen Präzipitation konnte dabei infolge der mit LARP7, Cdk9 und HEXIM1, jedoch nicht mit dem Kontrollantikörper kopräzipitierten 7SK RNA nachgewiesen werden (Abb. 17, untere Teilabb.). Interessanterweise ließ bereits der Vergleich der einzelnen Eluate im Silber gefärbten Gel eine signifikante Übereinstimmung der Proteinzusammensetzung erkennen.



**Abbildung 17: LARP7 ist Bestandteil des 7SK RNP.**

anti LARP7 (Spur 1), anti-Cdk9 (Spur 2) und anti-HEXIM1 (Spur 3) Immunpräzipitationen wurden zusammen mit einer unspezifischen Kontrolle (Spur 4) im silbergefärbten SDS-PAGE analysiert. Mit einem Stern markierte Banden wurden massenspektrometrisch als Cyclin T1, LARP7, HEXIM1 und Cdk9 in den jeweiligen Immunpräzipitaten identifiziert. Hc bezeichnet die schwere, lc die leichte Kette des Antikörpers. Die untere Teilabbildung zeigt einen Nachweis der Kopräzipitation von 7SK RNA mittels reverser Transkription.

Außer in der Kontrollelution (Spur 4) zeigten sich neben dem eigentlichen Antigen in jedem der immunaffinitätsgereinigten Komplexe prospektive Banden von Cdk9, Cyclin T1, HEXIM1 bzw.

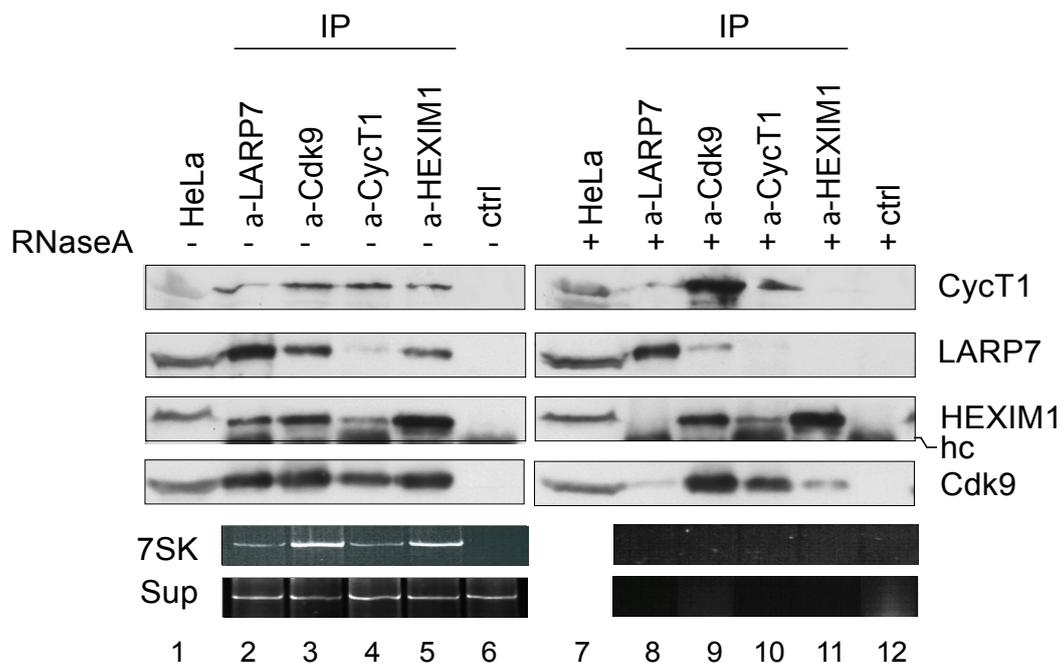
LARP7, welche als solche in einer massenspektrometrischen Analyse bestätigt werden konnten. Überdies wurden in der LARP7 Reinigung substöchiometrische Mengen des kürzlich identifizierten 7SK RNP assoziierten Methylphosphat-Capping-Enzyms MePCE sowie von hnRNP A1 detektiert (Jeronimo, Forget et al. 2007; Van Herreweghe, Egloff et al. 2007). Letzteres konnte in Studien von Barrandon et al. als ein, abhängig vom zellulären Transkriptionsstatus, mit 7SK RNA interagierender Faktor beschrieben werden, welcher die 7SK RNP Bildung *in vivo* zu beeinflussen scheint (Barrandon, Bonnet et al. 2007).

Obwohl die regulatorischen Mechanismen der 7SK RNP Biogenese noch weitgehend unklar sind, tritt deren Abhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen mehr und mehr in den Vordergrund (Chen, Yang et al. 2004; Contreras, Barboric et al. 2007). Modifikationen an HEXIM1 und Cyclin T1 scheinen dabei eine ähnlich wichtige Rolle zu spielen wie die reversible Phosphorylierung von Cdk9, welche sich direkt auf die Interaktion mit 7SK RNA auswirkt (Garber, Mayall et al. 2000; Chen, Yang et al. 2004; Contreras, Barboric et al. 2007). Interessanterweise konnten anhand der massenspektrometrischen Analyse des aus HeLa-Zellen isolierten LARP7 zwei Phosphorylierungsstellen, eine bereits beschriebene S268 Phosphorylierung und eine noch unbekannt Phosphorylierung an Serin 306, nachgewiesen werden, wobei deren physiologische Bedeutung noch offen bleibt. Die massenspektrometrischen Daten ergänzen somit die durchgeführten Kosedimentations- und Lokalisationsstudien und belegen LARP7 als eine neue, *in vivo* phosphorylierte, Komponente des 7SK RNP.

#### **5.4.4 Die Assoziation von LARP7 mit dem 7SK RNP wird im Wesentlichen durch die RNA vermittelt**

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Bindung einzelner 7SK RNP Komponenten einer definierten Abfolge gehorcht. Weder HEXIM1 noch 7SK RNA assoziieren alleine, sondern nur nach Bildung des HEXIM1 / 7SK RNA Heterodimers, mit P-TEFb (Yik, Chen et al. 2003; Michels, Fraldi et al. 2004). Infolgedessen ergaben sich für die Interaktion von LARP7 mit dem 7SK RNP wenigstens zwei

vorstellbare Szenarien. Einerseits könnte die Bindung von LARP7 an P-TEFb der des Heterodimers vorausgehen und diese stimulieren. Andererseits könnte erst die Ausbildung eines HEXIM1 / 7SK RNA / LARP7 Trimers eine Bindung an P-TEFb ermöglichen. Daher stellte sich zunächst die Frage nach der Abhängigkeit der LARP7 Interaktion mit P-TEFb von Protein-Protein oder Protein-RNA Wechselwirkungen. Um zwischen beiden differenzieren zu können, wurden Ko-Immunpräzipitationen aus unbehandeltem bzw. RNase behandeltem HeLa-Extrakt durchgeführt. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, konnten LARP7, HEXIM1, Cdk9, CycT1 sowie 7SK RNA in Präzipitaten mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern, nicht jedoch mit einem unspezifischen Kontrollserum, nachgewiesen werden (Spuren 2-6). Zu bemerken war ferner eine reduzierte Bindung von LARP7 an CyclinT1 in den jeweiligen Immunpräzipitationen (vgl. Spuren 2 und 4).



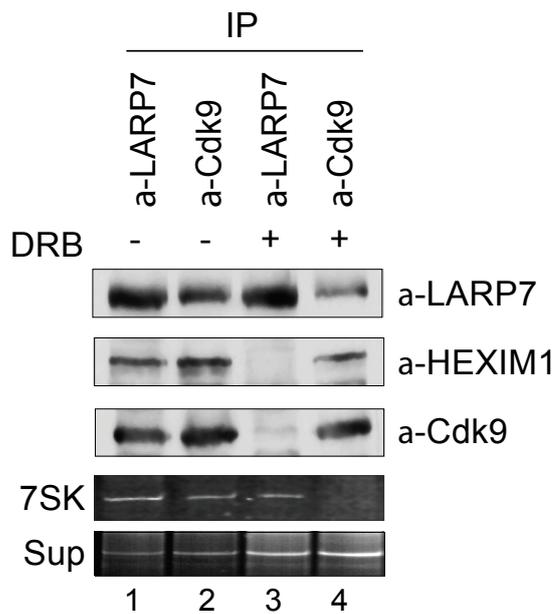
**Abbildung 18: 7SK RNA ermöglicht die Bindung von LARP7 an P-TEFb.**

Immunoblotanalyse von anti-LARP7, anti-Cdk9, anti-Cyclin T1, anti-HEXIM1 und Kontroll-Immunpräzipitationen aus unbehandeltem (Spuren 1-6) oder RNase behandeltem (Spuren 7-12) HeLa-Zellextrakt. Die untere Teilabbildung zeigt eine Ethidiumbromidfärbung der in den Immunpräzipitaten (7SK) und der Überständen (Sup) enthaltenen 7SK RNA. LARP7 ko-präzipitiert aus unbehandeltem Extrakt 7SK RNA, Cdk9, HEXIM1 und in geringerer Masse Cyclin T1. Nach quantitativem Abbau von 7SK RNA (Spuren 8-12 unten) lässt sich ein Verlust der LARP7 Assoziation mit Cdk9 (vgl. Spuren 8 und 9), Cyclin T1 (vgl. Spuren 8 und 10) und HEXIM1 (vgl. Spuren 8 und 11) erkennen. Hc bezeichnet die schwere Kette des Antikörpers.

Dieses Muster veränderte sich deutlich nach Behandlung der Extrakte mit RNase (Spuren 7-12). Obwohl LARP7 unter diesen Bedingungen effizient präzipitiert wurde, konnten weder Cdk9 noch Cyclin T1 oder HEXIM1 ko-präzipitiert werden (vgl. Spuren 8-11). Ebenso konnte LARP7 nicht in Immunpräzipitationen von Cdk9, CyclinT1 oder HEXIM1 aus RNase behandeltem Extrakt nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise zeigte sich im Gegensatz zu bereits publizierten Daten eine residuale Bindung von HEXIM1 an P-TEFb, trotz vollständiger Degradation der RNA (vgl. Spuren 9 und 10) (Yik, Chen et al. 2003). Die fehlende Assoziation von LARP7 mit dem 7SK RNP unter RNase Bedingungen lässt daher den Schluss zu, dass die LARP7 Bindung hauptsächlich durch 7SK RNA vermittelt wird.

### ***5.4.5 Unter Stressbedingungen dissoziiert LARP7 gemeinsam mit 7SK RNA vom Komplex***

Infolge der Abhängigkeit der LARP7 Bindung von 7SK RNA schien ein Modell der Rekrutierung eines trimeren inhibitorischen Komplexes aus HEXIM1, 7SK RNA und LARP7 an P-TEFb nicht unwahrscheinlich. Wie in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte, führen niedrige Dosen Stress induzierender Agenzien wie Actinomycin D oder DRB (5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-Benzimidazol) in HeLa-Zellen zu einer Trennung von 7SK RNA und P-TEFb, woraufhin die effektive Transkriptionsrate ansteigt (Nguyen, Kiss et al. 2001; Yang, Zhu et al. 2001). Aufgrund der essentiellen Bedeutung der RNA für die Interaktion von P-TEFb mit LARP7 stand somit die Frage offen, ob sich letztere unter Stressbedingungen ebenso verändert. Um zu untersuchen welche Proteine vor und nach der Dissoziation von P-TEFb noch mit dem 7SK RNP assoziiert vorliegen, wurde LARP7 bzw. Cdk9 aus Extrakten von DRB behandelten oder von Kontroll-Zellen immunpräzipitiert. Aus unbehandeltem Kontrolleextrakt konnten in jeder der beiden Präzipitationen LARP7, HEXIM1, Cdk9 und 7SK RNA nachgewiesen werden (Abb. 19 Spuren 1 und 2).



**Abbildung 19: Die LARP7 / 7SK RNA Interaktion bleibt unter DRB-Behandlung stabil.**

Immunpräzipitationen mit anti-LARP7 oder anti-Cdk9 Antikörpern aus unbehandelten (Spuren 1 und 2) oder DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-Benzimidazol) behandelten (Spuren 3 und 4) HeLa-Zellextrakten. Die Immunoblotanalyse mit den auf der rechten Seite angegebenen Antikörpern macht einen Verlust der Cdk9 und HEXIM1 Interaktion mit LARP7 nach DRB-Behandlung sichtbar (Spur 3). Unter diesen Bedingungen bleibt 7SK RNA mit LARP7, nicht jedoch mit Cdk9 assoziiert, wie anhand der Ethidiumbromidfärbung der kopräzipitierten RNA erkennbar.

Indessen dissoziierten nach Behandlung der Zellen mit DRB sowohl HEXIM1 als auch Cdk9, wohingegen 7SK RNA zusammen mit LARP7 kopräzipitiert werden konnte (Spur 3). Dies bestätigte auch die Analyse der anti-Cdk9 Immunpräzipitation aus DRB behandeltem Extrakt. Während Cdk9 in Abwesenheit von 7SK RNA effizient präzipitiert werden konnte, zeigte sich eine im Vergleich zum Kontrolleextrakt signifikant verringerte Menge an HEXIM1 und LARP7 (Spur 4). Zusammengenommen lässt sich diesen Daten daher entnehmen, dass LARP7, im Gegensatz zu P-TEFb und HEXIM1, nach der Auflösung der 7SK RNP stabil mit der RNA assoziiert bleibt.

## 5.5 Multiple Interaktionen innerhalb des 7SK RNP

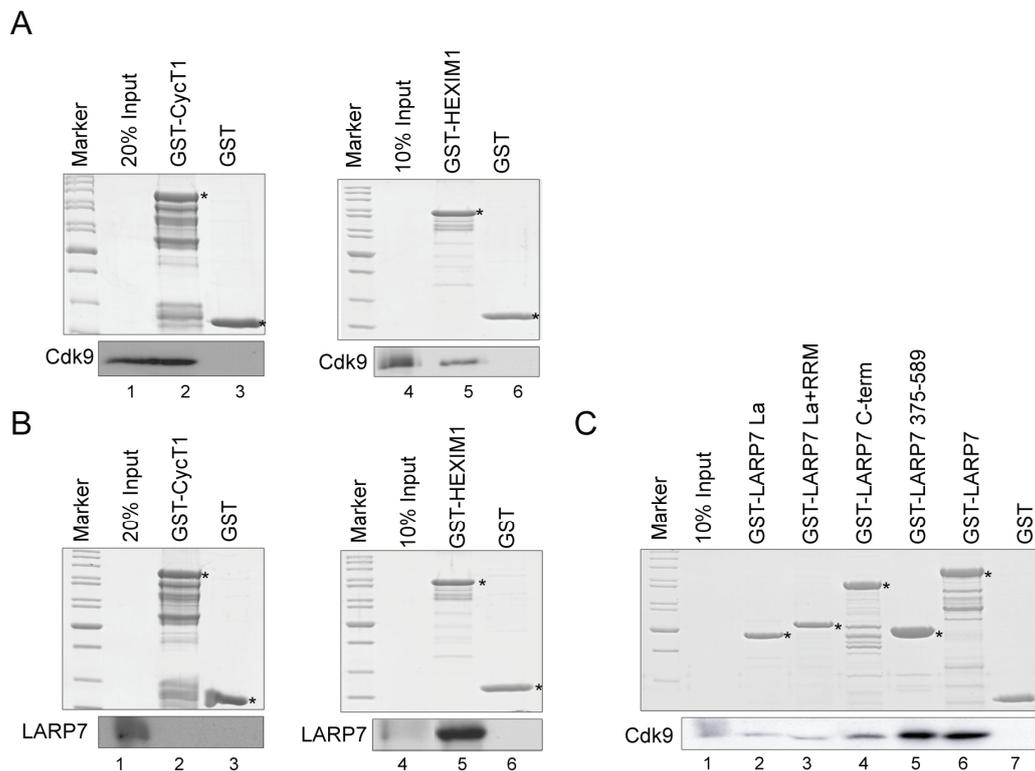
Anhand der bislang erhaltenen Daten präsentierte sich LARP7 als ein, hauptsächlich über die RNA interagierender, 7K RNP assoziierter Faktor *in vivo*. In mehreren Arbeitsgruppen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Stabilität des 7SK RNP außer durch die Struktur-gebende Funktion der RNA auch durch Protein-Protein Interaktionen gewährleistet wird (Dames, Schonichen et al. 2007; Van Herreweghe, Egloff et al. 2007). Daher sollte im Rahmen einer Reihe von *in vitro* Bindungsstudien der Frage nachgegangen werden, welche

Wechselwirkungen LARP7 mit den Bestandteilen des 7SK RNP im Einzelnen einget.

### **5.5.1 LARP7 bindet an HEXIM1 und Cdk9, jedoch nicht an Cyclin T1**

Um direkte Interaktionen zwischen den Proteinen des 7SK RNP nachweisen zu können, wurden zunächst GST-Fusionsproteine von Cyclin T1 und HEXIM1 rekombinant in *E. coli* exprimiert, an Gluathion-Sepharose affinitätsgereinigt und mit *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S] markiertem Cdk9 inkubiert. Die mehrfach gewaschenen Komplexe wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie Blue gefärbt und mittels Autoradiographie auf die Bindung von Cdk9 hin analysiert.

Hierbei zeigte sich in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten eine hochaffine Interaktion von Cdk9 mit Cyclin T1 (Abb. 21 A Spur 2). Unerwarteterweise konnte ebenfalls eine schwache Bindung von Cdk9 an HEXIM1 nachgewiesen werden, die nicht in der GST-Kontrolle zu beobachten war (Spuren 5 und 6). Analoge Untersuchungen mit *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S] markiertem LARP7 ließen hingegen eine nahezu quantitative Assoziation von LARP7 mit HEXIM1 erkennen, wohingegen keine direkte Interaktion von LARP7 mit Cyclin T1 zu beobachten war (Abb. 21 B Spuren 2 und 5). Auffällig stark erschien auch eine Bindung von LARP7 an Cdk9 (Abb. 21 C Spur 6). Eine genauere Analyse dieser Interaktion mithilfe von LARP7 Deletionsmutanten zeigte, dass die Bindung an Cdk9 speziell durch den C-Terminus von LARP7 vermittelt wird (vgl. Spuren 2 und 3 mit 4-6). Diese Daten legen somit den Schluss nahe, dass LARP7 auf Proteinebene sowohl mit der inhibitorischen Komponente des 7SK RNP, HEXIM1, als auch über das C-terminale Ende mit P-TEFb selbst interagiert.



**Abbildung 20: LARP7 bindet an HEXIM1 und C-Terminal an Cdk9.**

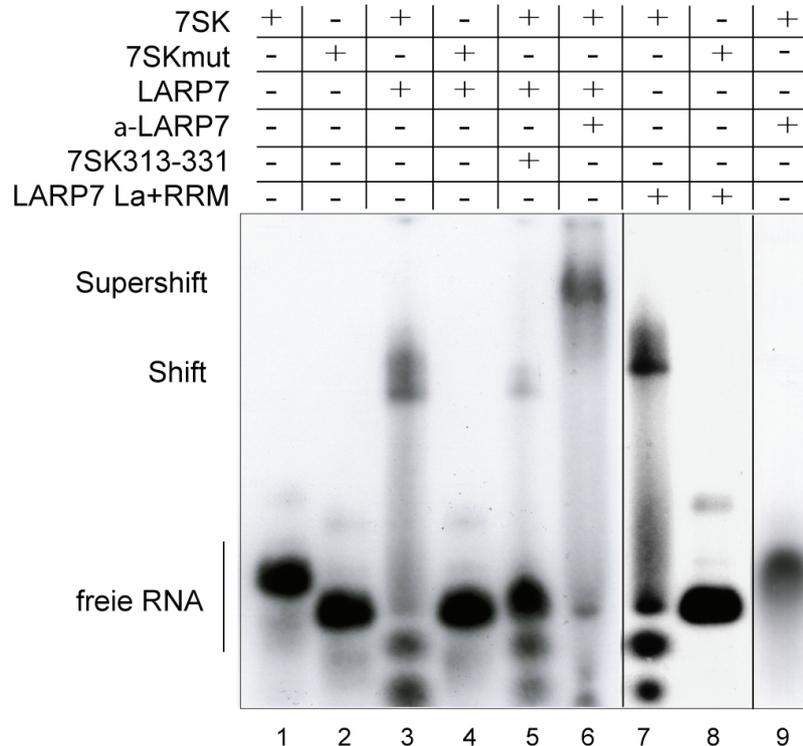
(A) In vitro translatiertes und [35S] markiertes Cdk9 bindet an rekombinantes GST-Cyclin T1 (Spur 2) und schwach an GST-HEXIM1 (Spur 5). Die Spuren 1 und 4 entsprechen 20% bzw. 10% des eingesetzten Translats, Spuren 3 und 6 zeigen die Bindung an GST. (B) In vitro translatiertes und [35S] markiertes LARP7 bindet kein GST-Cyclin T1 (Spur 2) jedoch effizient GST-HEXIM1 (Spur 5). Die Spuren 3 und 6 zeigen die Bindung an GST, die Spuren 1 und 4 20% bzw. 10% des eingesetzten Translats. (C) Kartierung der Cdk9 LARP7 Bindung. In vitro translatiertes und [35S] markiertes Cdk9 bindet volle Länge und C-Terminale Fragmente von GST-LARP7 (Spuren 4-6) nicht jedoch die N-terminalen La- bzw. RRM-Domänen (Spuren 2-4). Spur 1 zeigt 10% des eingesetzten Translats, Spur 7 die Bindung an GST. Volle Länge GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern markiert

### 5.5.2 Die La- und RRM1-Domäne von LARP7 sind für die Bindung an das 3'-Ende der 7SK RNA essentiell

Wie sich in diversen Arbeiten herausstellte, rekrutieren individuelle Sequenzelemente von 7SK RNA verschiedene Komponenten des RNP und koordinieren so deren Bindung (Michels, Fraldi et al. 2004; Egloff, Van Herreweghe et al. 2006). Interessanterweise zeigte sich nach näherer Betrachtung der RNA-Sequenz eine konservierte Abfolge von 9 Pyrimidinresten an deren 3'-Ende mit Ähnlichkeit zu 5'-TOP-Motiven (vgl. Abbildung 6). Aufgrund der intrinsischen Affinität von LARP7 zu Pyrimidin-reicher RNA, die anfänglich zu dessen Identifikation als

## Ergebnisse

Oligo-U bindendes Protein führte, lag eine direkte Interaktion von LARP7 mit dem 3'-7SK RNA Ende nahe.



**Abbildung 21: LARP7 bindet N-terminal an das 3'-Ende von 7SK RNA.**

Native RNA-Gelelektrophorese [ $^{32}\text{P}$ ] markierter wildtypischer (Spuren 1, 3, 5, 6, 7, 9) 7SK RNA oder einer um 18 3'-terminale Nukleotide verkürzten 7SK RNA Mutante (Spuren 2, 4, 8) nach Inkubation mit mit LARP7 (Spuren 3-6) oder einem N-terminalen LARP7 Fragment (Spuren 7 und 8). Die Bildung eines LARP7 / 7SK RNA Komplexes (Spur 3) reduziert sich nach Zugabe eines 10-fach molaren Überschusses eines unmarkierten Oligonukleotides der 18 3'-terminalen 7SK RNA Nukleotide (Spur 5). In den Spuren 6 und 9 wurde der Reaktion anti-LARP7 Antikörper zugegeben.

Um diese Hypothese experimentell zu untersuchen, wurde rekombinant exprimiertes LARP7 mit [ $^{32}\text{P}$ ]-markierter 7SK RNA oder einer 3'-terminal um 18 Nukleotide verkürzten Mutante inkubiert und die erhaltenen Komplexe mittels nativer RNA-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 22). Dabei ließ sich eine Assoziation von LARP7 nur mit der intakten (Spur 3), nicht jedoch mit der 3'-verkürzten 7SK RNA (Spur 4) erkennen. Ferner zeigte sich nach Zugabe eines 10-fach molaren Überschusses an unmarkierter, die 18 3'-terminalen 7SK Nukleotide umfassenden, RNA eine effiziente Konkurrenz mit der wildtypischen Sequenz in Form einer stark reduzierten Komplexbildung

(Spur 5). Dieser Komplex ließ sich, im Gegensatz zur RNA alleine, nach Zugabe von anti-LARP7 Antikörpern in einen höhermolekularen Bereich verschieben und bestätigte somit eine direkte und spezifische Bindung von LARP7 an das 3'-Ende der 7SK RNA (Spur 6).

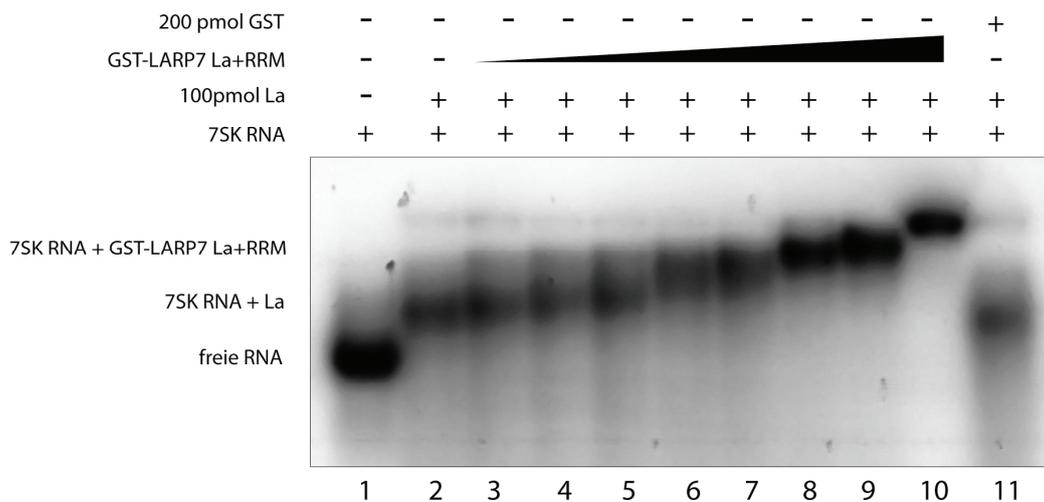
Um zu überprüfen, ob die als RNA bindend bekannten La- und RRM-Domänen, die Interaktion von LARP7 mit 7SK RNA vermitteln, wurde ein N-terminales, diese Domänen enthaltendes LARP7 Fragment in *E. coli* exprimiert, affinitätsgereinigt und mit [<sup>32</sup>P]-markierter 7SK RNA inkubiert. Wie in Abbildung 22 Spur 7 erkennbar, zeigte dieses N-terminale Fragment eine ebenso starke Bindung an 7SK RNA wie das volle Länge Protein, jedoch keine Bindung an die mutierte Sequenz (Spur 8). Folglich vermitteln die La- und RRM- Domäne von LARP7 dessen Interaktion mit dem pyrimidinreichen 3'-Ende der 7SK RNA.

### **5.5.3 LARP7 konkurriert mit La um die Bindung an 7SK RNA**

Anti-La Autoantikörper aus Patienten mit systemischem Lupus erythematosus reagieren mit einer Vielfalt zellulärer RNPs, deren RNA Komponenten ausnahmslos von PolIII transkribiert werden (Lerner and Steitz 1979; Lerner and Steitz 1981). La bindet dabei über seine La- und RRM-Domäne direkt an Pyrimidin reiche Regionen dieser RNAs. 7SK RNA macht als PolIII Transkript hiervon keine Ausnahme. Allerdings konnte La weder in Immunoblot- noch in massenspektrometrischen Analysen immunpräzipitierter 7SK RNP Komplexe aus HeLa-Zellen detektiert werden (He, Jahchan et al. 2008). Da La wie auch LARP7 die gleiche U-reiche 3' terminale Region von 7SK RNA binden, lag die Vermutung nahe, dass La im Verlauf der 7SK RNP Biogenese durch LARP7 ersetzt wird. Um dieser These nachzugehen, wurde [<sup>32</sup>P]-markierte 7SK RNA mit rekombinantem La alleine, oder zusammen mit steigenden Mengen eines GST-Fusionsproteins der La- und RRM- Domäne von LARP7 inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden im nativen RNA-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Hierbei konnte zunächst die bereits beschriebene direkte Bindung von La an 7SK RNA verifiziert werden. Weiterhin zeigte sich nach Zugabe von GST-LARP7 La+RRM ein zweiter, höhermolekularer Komplex, welcher ab einem ca. 1,2 fachen molaren Überschuss von GST-LARP7 La+RRM über La deutlich

## Ergebnisse

dominierte (Spur 8). Dieser Komplex ließ sich nicht auf eine Interaktion des GST-Fusionsanteils von LARP7 La+RRM mit der RNA zurückführen, da GST alleine keine weitere Verschiebung des La 7SK RNA Komplexes hervorrief (vgl. Spur 2 und Spur 11). Zusammengenommen lassen diese Daten daher den Schluss zu, dass 7SK RNA, wie alle neu synthetisierten PolIII Transkripte, zwar an La bindet, jedoch eine höhere Affinität zu LARP7 aufweist.



**Abbildung 22: LARP7 ersetzt La am 3´-Ende von 7SK RNA.**

Native RNA-Gelelektrophorese [<sup>32</sup>P] markierter 7SK RNA nach Inkubation mit rekombinantem La (Spur 2) oder mit La und steigenden Mengen eines GST-Fusionsproteins der La und RRM-Domäne von LARP7 (Spuren 3-10). Spur 1 entspricht der freien 7SK RNA, in Spur 11 wurde 7SK RNA mit La und GST inkubiert. Ab einem ca. 1,2 fachen molaren Überschuss von GST-LARP7 La+RRM über La ist die Bildung eines La / 7SK RNA Komplexes nicht länger erkennbar (Spur 8).

## 5.6 LARP7 übernimmt eine entscheidende Funktion in der PolII vermittelten Transkription

Die bislang einzig bekannte Aufgabe des 7SK RNP liegt in der Regulation der Verfügbarkeit von P-TEFb, welche im Wesentlichen durch dessen Interaktion mit 7SK RNA kontrolliert wird. Anhand der bisherigen Resultate präsentierte sich LARP7 als Bindeglied zwischen beiden Faktoren, wobei dessen N-Terminus mit 7SK RNA, der C Terminus hingegen mit P-TEFb interagiert. Daher erschien eine potentielle Rolle von LARP7 in der Regulation der Transkription von PolII eine attraktive Hypothese.

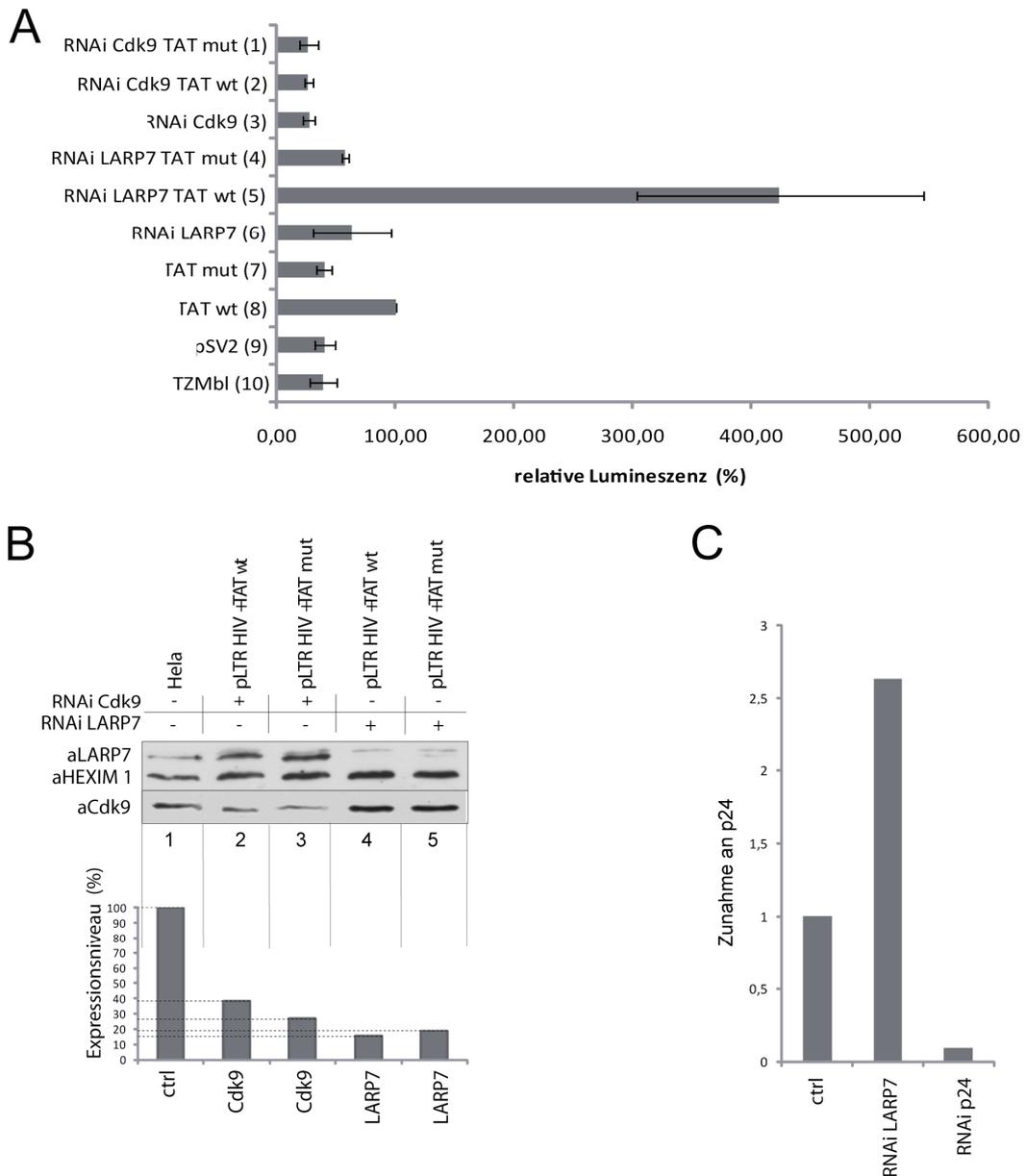
### **5.6.1 LARP7 reprimiert die Tat abhängige Transkription von HIV und reguliert die Bildung infektiöser Viruspartikel**

Ein etabliertes Modellsystem der P-TEFb abhängigen Transkriptionselongation durch PolII ist die Regulation der proviralen HIV-1 Transkription, welche insbesondere durch die selektive Rekrutierung und Aktivierung von P-TEFb mit Hilfe des transkriptionellen Transaktivators Tat gesteuert wird (Price 2000). Um die Bedeutung von LARP7 für diesen Prozess näher untersuchen zu können, wurde die Tat vermittelte Transkription ausgehend vom HIV-1 LTR Promotor in An- und Abwesenheit von LARP7 analysiert.

Hierzu wurden Reporterstudien in TZMbl Zellen, welche eine stabil integrierte Luziferase aus *P. pyralis* unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors exprimieren durchgeführt. Die Expression des Luziferase-Reporters wurde zunächst durch Transfektion eines für wildtypisches Tat oder eine, aus HIV-Patienten isolierte, nicht funktionale Tat Mutante kodierenden Plasmids induziert und nach 24 Stunden luminometrisch bestimmt (Abb. 24 A). Dabei bestätigte sich die strikte Abhängigkeit der HIV-1 Transkription von funktionellem Tat, da die Expression einer inaktiven Tat Mutante nur ein schwaches, nicht über dem untransfizierter oder Kontrollzellen liegendes, Signal aufwies (vgl. Spur 7 mit Spuren 9 und 10). Eine deutliche Stimulation der Luziferase Expression ließ sich dagegen nach Transfektion von wildtypischem Tat erkennen (Spur 8). Infolgedessen wurde dieses System zum Test der Abhängigkeit der HIV-1 Transkription von LARP7 eingesetzt.

TZMbl-Zellen wurden mit kleinen komplementären RNAs (*small interfering RNA*, siRNA) gegen Cdk9 bzw. LARP7 transfiziert, um die Expression dieser Proteine zu unterdrücken. Nach einer 24 stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit den jeweiligen siRNAs behandelt. Parallel dazu wurde ein für wildtypisches oder mutantes Tat kodierendes Plasmid ko-transfiziert. Die jeweiligen Luziferase-Expressionsraten und *knockdown*-Effizienzen wurden nach 24 Stunden luminometrisch bzw. durch Immunoblot der gewonnenen Zellextrakte bestimmt (Abb. 24 A).

## Ergebnisse



### Abbildung 23: LARP7 beeinflusst die Tat abhängige Transkription in vivo.

(A) Vergleich der Luziferaseaktivitäten in LARP7 bzw. Cdk9 defizienten TZMbl Zellen. Exponentiell wachsende TZMbl-Zellen, welche Luziferase unter der Kontrolle des HIV-LTR Promotors exprimieren, wurden mit siRNAs gegen LARP7 oder Cdk9 behandelt. Nach 24 Stunden wurden die siRNAs erneut, zusammen mit einem wildtypisches oder mutantes Tat kodierenden Plasmid transfiziert. Im Vergleich mit nicht (Reihe 10) oder mit einem Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen (Reihe 9) steigt die Luziferaseaktivität nach Transfektion von intaktem (Reihe 8), nicht jedoch nach Transfektion mutanten Tats (Reihe 7). Die Stimulation der Reportergen-Expression nach siRNA vermittelter LARP7 Reduktion ist in Reihe 5, die reprimierende Wirkung des Cdk9 knockdowns in Reihe 2 dargestellt. In Abwesenheit von Tat (Reihen 3 und 6) oder nach Expression mutanten Tats (Reihen 1 und 4) ist keine Änderung der Luziferaseaktivität erkennbar.

(B) Quantifizierung der LARP7 und Cdk9 knockdown Effizienz aus Abb. 24 A. Eine anti-LARP7, anti-HEXIM1 und anti-Cdk9 Immunoblotanalyse aus LARP7 (Spuren 3 und 4) oder Cdk9 (Spuren

2 und 3) siRNA behandelten Zellen wurde densitometrisch ausgewertet und die jeweiligen Werte auf die HEXIM1, Cdk9 und LARP7 Expression in unbehandelten Zellen (Spur 1) normalisiert. (C) p24 ELISA in ACH2 Zellen nach knockdown von LARP7. ACH2 Zellen wurden mit p24 (RNAi p24) oder LARP7 (RNAi LARP7) siRNAs transfiziert und nach 24 Stunden auf die Bildung von Virionpartikeln im Überstand hin untersucht. Ein knockdown von LARP7 stimuliert die p24 Bildung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (ctrl)

Die 80%ige Reduktion der Expression von LARP7 in Anwesenheit von Tat führte bemerkenswerterweise zu einer weiteren Zunahme der Transkription um das drei- bis vier-fache (Spur 5, Abb. 24 B Spur4). Im Gegensatz dazu konnte nach *knockdown* von Cdk9 ein signifikanter Rückgang der Transkriptionsaktivität beobachtet werden, entsprechend einer essentiellen Rolle von P-TEFb in der Tat vermittelten HIV-1 Transkription (Spur 2, Abb. 24 B Spur 2).

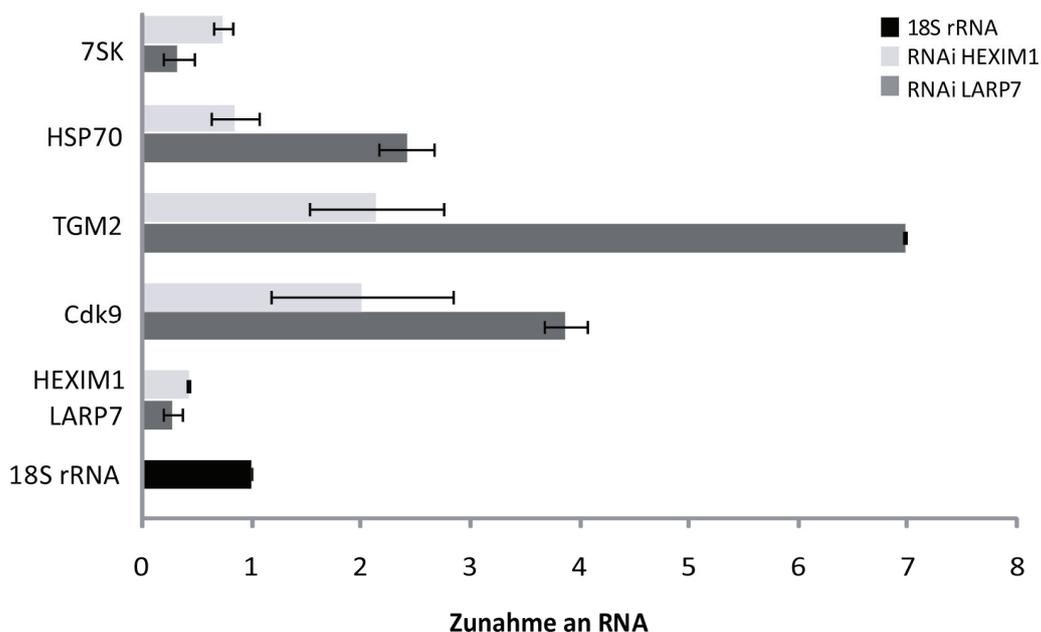
In keinem der beiden Fälle zeigte sich jedoch eine Veränderung der Transkription in Abwesenheit von Tat oder nach Expression einer infunktionalen Tat Mutante (Spuren 1, 3, 4, 6). Identische Ergebnisse konnten auch nach Verwendung einer zweiten, eine unterschiedliche Region von LARP7 bindenden, siRNA erhalten werden, wodurch sich die Spezifität des LARP7 *knockdowns* bestätigte. Diese Befunde demonstrieren somit eindeutig, dass LARP7 die Tat abhängige Transkription *in vivo* reprimiert.

Dies konnte ebenfalls in chronisch HIV infizierten T-Zellen (ACH2-Zellen) nachgewiesen werden, wobei die Bildung infektiöser Viruspartikel als direktes Maß der HIV- Transkription diente. Hierzu wurden ACH2 Zellen mit LARP7 oder p24 siRNAs behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Zunahme des Virustiters anhand der Menge an HIV p24 Hüllprotein im Überstand mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) quantifiziert (Abb. 24 C). Im Vergleich zu unbehandelten ACH2 Kontrollzellen (ctrl) zeigte sich dabei eine Erhöhung der HIV Transkription unter LARP7 *knockdown* (RNAi LARP7) und eine Abnahme der Virionbildung nach siRNA vermittelter Reduktion von p24 (RNAi p24). Infolgedessen validieren diese Daten eine regulatorische Funktion von LARP7 in der Transkription von HIV-1 *in vivo*.

### 5.6.2 Die Reduktion der LARP7-Expression resultiert in einer signifikanten Steigerung der zellulären Transkription

Die bisherigen Resultate präsentieren LARP7 als eine neue Komponente des 7SK RNP, dessen spezifischer *knockdown* eine Zunahme der HIV-1 Transkription *in vivo* bewirkt. Somit fungiert LARP7 als P-TEFb Repressor der Tat abhängigen PolII Transkription. Da P-TEFb jedoch die Mehrheit aller PolII Gene reguliert, lag der Schluss nahe, dass LARP7 als integraler Bestandteil des 7SK RNP auch Einfluss auf die generelle, zelluläre PolII Transkription nehmen könnte.

Um diese Frage zu beantworten wurden proliferierende HeLa-Zellen mit siRNAs gegen LARP7 (Abb. 25, dunkelgraue Balken) oder den bereits bekannten P-TEFb Inhibitor HEXIM1 transfiziert (hellgraue Balken).



**Abbildung 24: Knockdown von LARP7 stimuliert die Transkription von PolII.**

Real-Time-PCR-Analyse der PolII vermittelten Transkription in Abhängigkeit von LARP7. HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen LARP7 (dunkelgraue Balken) oder HEXIM1 (hellgraue Balken) transfiziert und nach 24 Stunden bezüglich der Transkription der PolII Klasse Gene HSP70, TGM2 und Cdk9 hin mittels Real-Time-PCR untersucht. Die Werte sind normalisiert auf die Transkription der 18S rRNA (schwarzer Balken) und in Relation zur jeweiligen Transkription in unbehandelten Zellen dargestellt. Nach knockdown von LARP7 zeigt sich eine, auch nach knockdown von HEXIM1 beobachtbare, verstärkte Transkription von TGM2, HSP70 und Cdk9, wohingegen die Stabilität von 7SK RNA abnimmt.

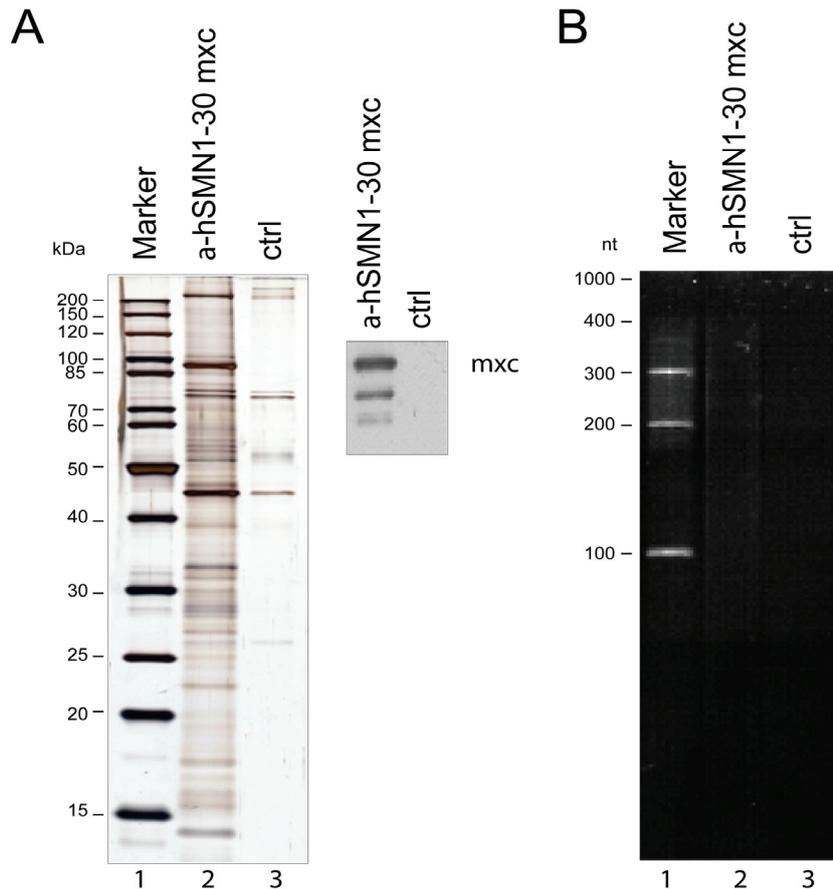
Nach 24 Stunden wurde die Gesamtzell-RNA präpariert, revers transkribiert und die Transkription einzelner PolII-Klasse Gene mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Hierzu wurden das auf Ebene der Transkriptionselongation regulierte HSP70 Gen und das Transglutaminase 2 Gen (TGM2) exemplarisch ausgewählt (Rougvie and Lis 1988). Letzteres weist, wie gezeigt werden konnte, eine erhöhte Expression in metastasierenden Brustkrebs-Zellen auf und wird als potentieller Tumorsuppressor diskutiert, weshalb eine Regulation dieses Faktors auf Transkriptionsebene nicht unwahrscheinlich erschien (Mehta, Fok et al. 2004; Ai, Kim et al. 2008). Als interne Kontrolle wurde die von PolI transkribierte ribosomale 18S RNA herangezogen, wobei die individuellen RNA Mengen der einzelnen Gene auf die der 18S rRNA (schwarzer Balken) in unbehandelten Zellen normalisiert wurden. Dabei konnte nach Reduktion der LARP7 Expression durch RNA Interferenz um ca. 73% eine drei- bis sieben-fach gesteigerte Transkription, sowohl für HSP70 als auch für TGM2 bzw. Cdk9 nachgewiesen werden.

Ein ähnlicher, wenn auch weniger ausgeprägter, Effekt zeigte sich bei allen untersuchten PolII Genen nach *knockdown* von HEXIM1 um 58%. Erstaunlicherweise nahm im Gegensatz zur Stimulation der PolII Transkription die Menge von 7SK RNA proportional zur Effizienz der LARP7 *knockdowns* ab. Infolgedessen scheint die Stabilität der 7SK RNA vor allem von deren Assoziation mit LARP7 abzuhängen, welche die RNA vor Abbau schützt. Darüber hinaus legt dies den Schluss nahe, dass 7SK RNA *in vivo* hauptsächlich mit LARP7 interagiert. Zusammengenommen identifizieren diese Daten LARP7 daher als einen über das 7SK RNP System agierenden Inhibitor der P-TEFb vermittelten Transkription viraler wie auch zellulärer PolII Klasse Gene.

### **5.7 Das *D. melanogaster* Homolog von LARP7, *mx*c, wird nicht in einen 7SK RNP ähnlichen Komplex inkorporiert**

Seit der Entdeckung der DRB sensitiven Kinaseaktivität von P-TEFb in *D. melanogaster* Kernextrakten konnten zahlreiche Cdk9 wie auch Cyclin T Orthologe in den Genomen von niederen Eukaryoten bis hin zu Säugern identifiziert werden (Marshall and Price 1995; Peterlin and Price 2006). Hingegen beschränkt sich das Auftreten von 7SK RNA, von wenigen Ausnahmen abgesehen, auf das Phylum der Chordaten und hier speziell auf das Subphylum der Vertebraten (Rfam). Auch HEXIM Proteine treten evolutiv erst spät, jedoch noch vor der Trennung von Chordaten und Arthropoden auf. Während in *D. melanogaster* beispielsweise ein entferntes HEXIM1 Ortholog nachweisbar ist, konnten bislang keine eindeutigen Hinweise für die Existenz eines entsprechenden 7SK RNA Homologs gefunden werden (Peterlin and Price 2006). Hinsichtlich der Interaktion von 7SK RNA mit LARP7 und der Bedeutung der RNA für die Regulation der 7SK RNP Biogenese ergab sich daher die Fragestellung, ob sich Orthologe von LARP7 auch in *Drosophila* identifizieren ließen, mit welchen RNAs sie assoziieren und ob diese ebenfalls in einen 7SK RNP ähnlichen Komplex inkorporiert werden. Eine spezieübergreifende Homologiesuche lieferte hierbei Orthologe von LARP7 in den Arthropodengenomen von *A. gambiae* und *D. melanogaster* (vgl. Abb. 11 B). *Multi sex combs* (*mx*c), das *Drosophila* Ortholog von LARP7, gehört der Gruppe der *Polycomb* Gene an, welche als Transkriptionsfaktoren die Expression der entwicklungsrelevanten Hox-Gene regulieren und an der Hämatopoese beteiligt sind (Remillieux-Leschelle, Santamaria et al. 2002). Wie in genetischen Studien gezeigt werden konnte, ist *mx*c in *D. melanogaster* ein essentielles Gen, dessen hypomorphe Mutation zu unkontrolliertem Zellwachstum führt und somit eine regulatorische Funktion dieses Proteins impliziert (Santamaria and Randsholt 1995; Saget, Forquignon et al. 1998). Um eine mögliche RNA Assoziation von *mx*c näher untersuchen zu können, sollte es zunächst mit einem in *Drosophila* nicht vorkommenden Affinitätsepitop des humanen SMN Proteins (hSMN 1-30) versehen und in *Drosophila* Schneider2 Zellen spezifisch angereichert werden (Kroiss, Schultz et al. 2008). Hierzu wurde die

aus Schneider2 Zellen isolierte *mx*c cDNA in den Expressionsvektor pMtagIt kloniert, retransfiziert und die Expression induziert. *Mxc* enthaltende Komplexe wurden daraufhin mithilfe des monoklonalen anti-SMN1-30 Antikörpers (7B10) aus dem gewonnenen Zelllysatsatz bzw. einem uninduzierten Kontrollextrakt affinitäts gereinigt und durch Peptidkompetition nativ von der Matrix eluiert.



**Abbildung 25: *mx*c, das *D. melanogaster* LARP7 Ortholog bildet keinen 7SK RNP ähnlichen Komplex.**

(A) Affinitätsreinigung *mx*c enthaltender Komplexe aus *Drosophila*. Schneider2 Zellen wurden mit einem Fusionskonstrukt der *mx*c cDNA und eines in *Drosophila* nicht vorkommenden Affinitäts epitops (hSMN1-30) transfiziert und die Expression mit CuSO<sub>4</sub> induziert. Spur 2 zeigt das Silber gefärbte Eluat einer Affinitätsreinigung des anti-hSMN1-30 (7B10 Antikörper) immunpräzipitierten *mx*c-Komplexes aus induzierten, Spur 3 eine Kontrolleluierung aus nicht induzierten Zellen. Die rechte Teilabbildung bestätigt die Präzipitation von hSMN1-30*mx*c mittels 7B10 Immunoblot. Spur 1 (B) RNA Assoziation von *mx*c. Die in den Immunpräzipitationen aus Abbildung 20 A enthaltene RNA wurde extrahiert und im denaturierenden RNA-Gel mittels Ethidiumbromidfärbung analysiert, wobei sich keine offensichtliche RNA Assoziation mit *mx*c erkennen lässt (Spur2).

Im Immunoblot der 7B10 Aufreinigung konnte dabei, im Gegensatz zum Kontrolleluat, eine effiziente Präzipitation von *mx*c nachgewiesen werden (Abb. 20 A rechts). Eine genauere Analyse der Eluate erfolgte mittels Massenspektrometrie Silber-gefärbter SDS-Gele, wobei in keiner der analysierten Banden *Drosophila* Orthologe von Cdk9, Cyclin T1 oder HEXIM1 nachgewiesen werden konnten. Auch eine Ethidiumbromidfärbung der kopräzipitierten RNA gab, anders als bei LARP7 beobachtet, keine spezifische Assoziation von *mx*c mit RNAs, weder im nieder- noch im höhermolekularen Bereich, zu erkennen (Abb. 20 B). Infolgedessen bildet *mx*c, trotz der apparenten Homologie der Domänenstruktur zu LARP7, keinen 7SK RNP ähnlichen Komplex in *D. melanogaster*.

## 6 Diskussion

Die Summe aller Protein-kodierenden Gene des Menschen (ca. 20.000-25.000) umfasst nur etwa 2 % des gesamten Genoms (Frith, Pheasant et al. 2005; Hattori 2005). Abgesehen von mRNA und den beiden anderen funktionellen RNA Klassen rRNA und tRNA, erschien der weitaus größte Teil des Genoms bislang als genetischer Ballast oder evolutiver Spielraum. Allerdings häufen sich zunehmend Anzeichen, dass die biologische Vielfalt in höheren Organismen nicht, wie angenommen, mit der Zahl der Protein-kodierenden, sondern vielmehr mit der Zahl der nicht Protein-kodierenden Sequenzen korreliert (Taft, Pheasant et al. 2007; Szell, Bata-Csorgo et al. 2008). Da in Säugern annähernd die Hälfte des Genoms Transkripte generiert, die keiner der drei oben genannten RNA Klassen zuzuordnen sind, begründen diese nicht kodierenden RNAs (ncRNAs) eine weitgehend uncharakterisierte Klasse mit potentieller regulatorischer Funktion. Viele der bislang bekannten ncRNAs stehen in Verbindung mit entwicklungsrelevanten Prozessen, Vorgängen der RNA-Prozessierung oder Genexpression (Pang, Stephen et al. 2005; Mattick and Makunin 2006). Unter letzteren sticht 7SK RNA aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für die generelle PolII abhängige Transkription deutlich hervor. Als Teil eines makromolekularen 7SK RNPs assoziiert 7SK RNA zusammen mit HEXIM1 reversibel mit dem positiven Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb und inhibiert so dessen Aktivität. Die Balance zwischen 7SK RNA gebundenem, inaktivem oder freiem, aktivem P-TEFb unterliegt dabei einer präzisen Kontrolle, deren Störung zu Fehlern in der RNA Synthese und letztendlich zur Entstehung von Krebs führen können. Trotz der hohen Abundanz von 7SK RNA in Säugerzellen, wird deren effektiv zur 7SK RNP Bildung verfügbare Zahl jedoch offensichtlich durch weitere 7SK RNA bindende Proteine reduziert. Wesentliche Aspekte der vorliegenden Arbeit beschäftigten sich daher mit der Frage, welche Faktoren die Integration von 7SK RNA in das RNP beeinflussen und somit die Elongation der Transkription von PolII regulieren.

Anhand von Immunpräzipitationen und direkten Bindungsstudien konnte im Rahmen dieser Arbeit zunächst das La ähnliche Protein

LARP7 als ein neuer 7SK RNA bindender Faktor beschrieben und charakterisiert werden. LARP7 bindet über seinen N-terminalen Bereich an eine Pyrimidin-reiche Sequenz am 3'-Terminus der 7SK RNA und erhöht so wesentlich deren Stabilität. Ferner ließen massenspektrometrische und immunohistochemische Daten, sowie die chromatographische Analyse des Komplexes LARP7 als neue Komponente des 7SK RNP erkennen. LARP7 assoziiert mit dem RNP ausschließlich nach Interaktion mit 7SK RNA und fungiert so als Bindeglied zwischen P-TEFb und der RNA. *In vitro* Bindungsstudien mit LARP7 zeigten darüber hinaus, dass die Stabilität des 7SK RNP zusätzlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit HEXIM1 und Cdk9 erhöht wird. Auf funktioneller Ebene konnte schließlich sowohl durch Reporterstudien in TZMbl Zellen als auch mittels Real-Time-PCR eine essentielle Rolle von LARP7 im Kontext des 7SK RNP nachgewiesen werden. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass LARP7 die zelluläre wie auch die HIV-1 Tat abhängige Transkription *in vivo* reprimiert. Dieser Effekt steht in Einklang mit einer LARP7 vermittelten Regulation der P-TEFb abhängigen Transkriptionselongation von PolII.

### **6.1 LARP7 assoziiert spezifisch mit 7SK RNA im Zellkern**

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand zunächst die Identifikation von Proteinen im Vordergrund, welche spezifisch an mRNAs mit einem 5' terminalen, Oligopyrimidin-reichen Motiv (TOP-Motiv) binden. Wie experimentell nachgewiesen werden konnte, rekrutiert dieses Motiv in nicht proliferierenden Zellen einen spezifischen Repressor, welcher die Translation der jeweiligen TOP-mRNA inhibiert (Levy, Avni et al. 1991; Biberman and Meyuhas 1999). In der Tat konnten infolge einer Tobramycin-Affinitätschromatographie einige, spezifisch mit dem wildtypischen TOP-Motiv assoziierte Proteine aufgereinigt werden (Abb.: 9B). Obwohl in der Elution in geringem Umfang auch einige bekannte Pyrimidin bindende Proteine, wie hnRNP K und einige SRP (signal recognition particle) Proteine detektiert werden konnten, wiesen eine Reihe von Indizien auf ein 75 kDa großes, massenspektrometrisch als LARP7 identifiziertes Protein: Erstens wurde LARP7 in einer Affinitätsreinigung einer wildtypischen TOP-Motiv

Elution spezifisch angereichert. Zweitens ließ sich die Assoziation dieses 75 kDa großen Faktors mit dieser RNA auch im UV-Crosslink erkennen und anhand von Depletionsexperimenten eindeutig auf LARP7 zurückführen (Abb.: 9A, 10C). Drittens zeigte sich bei näherer Betrachtung der Domänenstruktur von LARP7 eine ausgeprägte Homologie zum humanen La Protein, welches bereits als Interaktor und Regulator Pyrimidin-reicher RNAs *in vitro* beschrieben werden konnte (Pellizzoni, Cardinali et al. 1996; Zhu, Hayakawa et al. 2001; Wolin and Cedervall 2002).

Erste Zweifel an einer generellen TOP-Motiv Bindung und damit einer potentiellen Rolle von LARP7 in der Regulation von TOP-mRNAs ergaben sich jedoch bereits nach Analyse der zellulären LARP7 Lokalisation. So konnte in HeLa wie auch in HEK 293T Zellen eine vom Zellstadium unabhängige, prädominant nukleäre Verteilung von LARP7 detektiert werden (Abb.: 12). Angesichts der hohen Abundanz von TOP-mRNAs und deren primär zytoplasmatischen Lokalisation erschien eine Rolle von LARP7 in der Translationsinhibition von TOP-mRNAs im Allgemeinen eher unwahrscheinlich. Allerdings ließ die Spezifität der beobachteten Pyrimidin Bindung *in vitro* die Vermutung zu, dass LARP7 auch *in vivo* mit Pyrimidin reichen RNAs interagieren könnte.

Infolgedessen wurden Immunpräzipitationsstudien aus HeLa-Kernextrakt durchgeführt, mit dem Ziel die Assoziation von LARP7 mit Pyrimidin reichen RNAs unter nativen Bedingungen verfolgen zu können. Zum einen ko-präzipitiert LARP7 hochmolekulare RNAs, deren Identität aber nicht im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurde. Zum anderen konnte jedoch eine prominente Interaktion mit einer 330 Nukleotiden großen RNA nachgewiesen werden, deren Identität mittels RT-PCR und Hybridisierung zweifelsfrei als 7SK RNA bestätigt wurde (Abb.: 13A/B). Die Bindung an 7SK RNA erwies sich zudem als hoch spezifisch, da sich auch bei Verwendung verschiedener LARP7 Affinitätsepitope sowie des rekombinant exprimierten LARP7 Proteins (Daten nicht gezeigt) eine effiziente und reproduzierbare Interaktion mit 7SK RNA erkennen ließ (Abb.: 13C). Außerdem wies 7SK RNA eine ähnlich subnukleäre Verteilung auf wie dies auch für LARP7 zu beobachten war (Egloff, Van Herreweghe et al. 2006). Infolgedessen ergab sich die Frage, welches Sequenzmotiv der RNA eine derart

selektive Bindung an LARP7 ermöglicht. Auffälligerweise findet sich am 3'-Ende von 7SK RNA ebenfalls eine ausgedehnte Pyrimidin-reiche Region. *In vitro* Bindungsstudien ließen erkennen, dass LARP7 spezifisch und unabhängig von weiteren Faktoren mit dieser Sequenz assoziiert, wobei die 18 3'-terminalen Nukleotide der RNA für eine stabile Interaktion mit LARP7 ausreichend waren (Abb.: 21). Dieser Bereich weist zudem eine sehr hohe Ähnlichkeit zur Konsensussequenz des TOP-Motivs auf (Meyuhas 2000), was die ursprüngliche *in vitro* Reinigung von LARP7 über das TOP-Motiv erklärt. Während die Bindung von LARP7 an das 3'-Ende von 7SK RNA somit eindeutig belegt werden konnte, bleibt eine potentielle, physiologische Relevanz der beobachteten TOP-mRNA Assoziation unklar.

## 6.2 LARP7 – eine zentrale Komponente des 7SK RNP

7SK RNA koordiniert innerhalb des makromolekularen 7SK RNPs die Bindung zwischen den beiden P-TEFb Komponenten CycT1/Cdk9 und dessen Inhibitor HEXIM1 (Michels, Fraldi et al. 2004). Aufgrund der direkten Interaktion von LARP7 mit 7SK RNA im Zellkern lag die Vermutung nahe, dass LARP7, wie 7SK RNA, Teil dieses RNP sein könnte. Mehrere experimentelle Hinweise bestätigten diese Hypothese. So zeigten Sedimentationsanalysen aus proliferierenden HeLa-Zellen, dass LARP7 in Form eines 12S Partikels nahezu quantitativ mit 7SK RNA und partiell mit P-TEFb und HEXIM1 ko-sedimentiert (Abb.: 14). Dies deutete maßgeblich auf eine Inkorporation von LARP7 in das 7SK RNP hin. Ferner konnte dieser Befund durch Gelfiltrationsstudien untermauert werden (Abb.: 15). Diese Daten zeigten, dass LARP7 ausschließlich zusammen mit Komponenten des 7SK RNP, nicht jedoch in den Fraktionen des aktiven P-TEFb Komplexes oder als monomere Einheit eluiert. Eine Funktion von LARP7 in der negativen Regulation von P-TEFb war demnach wahrscheinlich.

Einen weiteren Anhaltspunkt für eine mögliche Integration von LARP7 in das RNP lieferten *in vivo* Lokalisationsdaten der einzelnen Komplexkomponenten. LARP7 ko-lokalisiert sowohl mit HEXIM1 als auch mit P-TEFb und weist wie diese eine homogene Verteilung im Kern auf (Abb.: 16). Ob LARP7, ähnlich wie P-TEFb und HEXIM1, auch

in definierten subnukleären Strukturen wie beispielsweise *speckles* (Spleißfaktorkompartimente) akkumuliert, ist allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar (Herrmann and Mancini 2001). Von Interesse wäre die Frage nach der Lokalisation von LARP7 besonders im Hinblick auf die Beobachtung, dass ein dynamisches Gleichgewicht zwischen inaktivem, ICG-assoziiertem P-TEFb (Interchromatin Granula in denen Spleißfaktoren akkumulieren, jedoch keine Transkription stattfindet) und aktivem, PF-assoziiertem P-TEFb (Perichromatinfibrillen, Orte aktiver Transkription) beschrieben wurde (Cmarko, Verschure et al. 1999; Barboric, Kohoutek et al. 2005). Als Bestandteil des 7SK RNP wäre LARP7 daher ebenfalls in ICG-speckles zu erwarten und sollte in Perichromatinfibrillen fehlen.

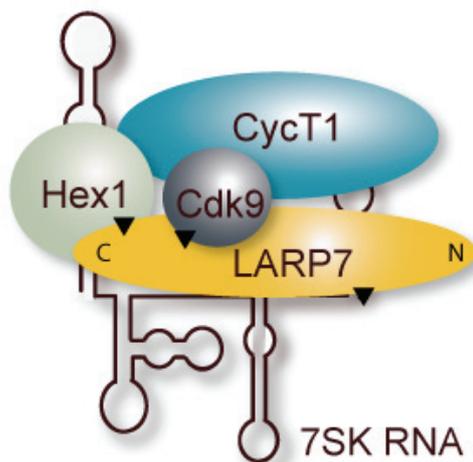
Experimentell konnte LARP7 als Bestandteil des 7SK RNP schließlich mittels immunaffinitätschromatographischer Reinigung und massenspektrometrischer Analyse des Komplexes bestätigt werden (Abb.: 17). Dabei zeigte sich, dass LARP7 neben Cdk9, Cyclin T1 und HEXIM1 auch hnRNP A1 als weiteren 7SK RNA assoziierten Faktor ko-präzipitiert. Möglicherweise ist LARP7 somit ebenfalls Teil des kürzlich entdeckten zweiten 7SK-enthaltenden RNPs, welcher sich nach Dissoziation von P-TEFb aus hnRNP A1 und 7SK RNA bildet (Van Herreweghe, Egloff et al. 2007).

### **6.3 LARP7, ein Bindeglied zwischen 7SK RNA und P-TEFb**

Die Beobachtung, dass LARP7 außer 7SK RNA zusätzliche Proteine des 7SK RNP präzipitiert, ermöglichte eine detaillierte Analyse dieser Interaktionen. In vorherigen Studien hatte sich bereits gezeigt, dass die Bindung von HEXIM1 an die 5'-Stamm-Schleife von 7SK RNA dessen Assoziation mit Cyclin T1 unterstützt (Egloff, Van Herreweghe et al. 2006). *In vitro* Bindungsstudien wiesen darüber hinaus auf eine direkte Interaktion von HEXIM1 und LARP7 hin (Abb.: 20B, 26). Diese Bindung stabilisiert während der Bildung des 7SK RNP möglicherweise eine Reihe komplexer Konformationsänderungen in HEXIM1, die sich als entscheidend für dessen Dimerisierung und Bindung an P-TEFb erwiesen (Barboric, Kohoutek et al. 2005). Ferner ließ sich eine direkte Bindung von LARP7 an Cdk9 erkennen, wobei sich hierfür primär der

C-Terminus von LARP7 verantwortlich zeichnet (Abb.: 20C). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass diese Region ebenfalls die Bindung von LARP7 an 7SK RNA beeinflusst, da *in vivo* bereits die Deletion des extremen C-Terminus in einem Verlust dieser Interaktion resultiert (He, Jahchan et al. 2008). Demnach übernimmt die C-terminale Region eine elementare Funktion innerhalb des 7SK RNPs, sowohl für die Bindung von LARP7 an 7SK RNA als auch für dessen Bindung an P-TEFb.

An Bedeutung gewinnt dieser Befund noch angesichts der Beobachtung, dass das LARP7 Gen eines derjenigen Gene darstellt, welches in gastrischen Tumorgeweben am häufigsten von Frameshift-Mutationen betroffen ist (Mori, Sato et al. 2002). Diese Mutationen treten vorwiegend in einer Sequenz auf, welche die C-terminale Region von LARP7 kodiert und letztendlich zu deren Deletion führen. Infolgedessen sind diese Mutanten offenbar nicht länger in der Lage P-TEFb in Form des 7SK RNP zu binden, was wiederum in einer Steigerung der Transkriptionsrate resultieren und damit ein unkontrolliertes Zellwachstum erklären würde.



**Abbildung 26: Modell des 7SK RNP**

LARP7 bindet HEXIM1 sowie das 3'-Ende von 7SK RNA. Die direkte Interaktion des LARP7 C-Terminus mit Cdk9 stellt den Kontakt zu P-TEFb her, welches über Cyclin T1 sowohl mit HEXIM1 als auch mit der 3'-Stamm-Schleife von 7SK RNA interagiert. Wechselwirkungen mit LARP7 sind durch ein ▼ markiert

Die vollständige Inaktivierung von P-TEFb erfordert daher höchstwahrscheinlich eine konzertierte Bindung an alle drei inhibitorischen Komponenten des 7SK RNP (Yik, Chen et al. 2003; Schulte, Czudnochowski et al. 2005; Egloff, Van Herreweghe et al. 2006).

#### **6.4 Die Interaktion zwischen LARP7 und 7SK RNA bleibt unter Stress stabil und ist Voraussetzung für die Bindung an P-TEFb**

Anhand verschiedener experimenteller Ansätze konnte nachgewiesen werden, dass die inhibitorischen 7SK RNP Komponenten, HEXIM1 und 7SK RNA P-TEFb ausschließlich in Form eines RNA/HEXIM1 Komplexes binden (Yik, Chen et al. 2003; Michels, Fraldi et al. 2004). Dabei hebt die Interaktion von 7SK RNA mit HEXIM1 eine intramolekulare Autoinhibition in HEXIM1 auf und ermöglicht dadurch dessen Dimerisierung sowie die anschließende Assoziation mit P-TEFb (Blazek, Barboric et al. 2005). Dies führte zu der Annahme, dass diese 7SK RNA/HEXIM1 Interaktion der limitierende Schritt der 7SK RNP Bildung sein könnte, welcher das Verhältnis zwischen P-TEFb und 7SK RNP *in vivo* bestimmt (Barboric, Kohoutek et al. 2005). Wie allerdings wird die Bindung von HEXIM1 an die RNA reguliert? Möglicherweise liegt die Antwort auf diese Frage in einem weiteren 7SK RNA assoziierten Faktor, dessen Bindung an die RNA jedoch vor der Interaktion mit HEXIM1 zu erwarten wäre. LARP7 erweist sich hierfür als aussichtsreicher Kandidat. Wie im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, wird P-TEFb nicht, wie bislang angenommen durch die Bindung eines HEXIM1/7SK RNA Heterodimers, sondern sehr wahrscheinlich durch einen trimeren Komplexes aus HEXIM1, 7SK RNA und LARP7 inhibiert.

Hierfür lieferten affinitätschromatographische Reinigungen des 7SK RNP aus RNase bzw. DRB behandelten Zellen entscheidende Hinweise. So ließ sich nach Behandlung mit RNase eine signifikant reduzierte Bindung von LARP7 an P-TEFb erkennen (Abb.: 18). Dies deutet zunächst darauf hin, dass die Bindung von LARP7 an P-TEFb maßgeblich durch 7SK RNA beeinflusst wird. Außerdem schließt dieser Befund aus, dass LARP7 bereits vor der Rekrutierung eines HEXIM1/7SK RNA Heterodimers mit P-TEFb assoziiert. Interessanterweise blieb nach RNase Behandlung noch eine residuale Bindung von LARP7 wie auch von HEXIM1 an P-TEFb zu erkennen. Folglich scheinen die beschriebenen Protein/Protein Wechselwirkungen das RNP zusätzlich zu stabilisieren, sobald der Kontakt mit P-TEFb über die RNA einmal hergestellt wurde. Eine derartige Interaktion ist für

HEXIM1 und Cyclin T1 auch bereits im Detail geklärt (Dames, Schonichen et al. 2007).

Die RNase sensitive Assoziation von LARP7 alleine erlaubt jedoch nicht den Schluss, dass es sich um einen trimeren P-TEFb bindenden Komplex aus LARP7, HEXIM1 und 7SK RNA handelt. Prinzipiell könnte LARP7 auch erst nach der Interaktion von P-TEFb mit dem Heterodimer rekrutiert werden. Dem widerspricht jedoch die Beobachtung, dass LARP7 quantitativ mit 7SK RNA interagiert und selbst unter Bedingungen, welche zu einer Dissoziation von HEXIM1 und 7SK RNA bzw. zur Auflösung des 7SK RNP führen, stabil mit dieser verbunden bleibt (Nguyen, Kiss et al. 2001; Yik, Chen et al. 2003).

Erkennbar wurde dies zum einen nach einer Behandlung mit dem Stress induzierenden Agens DRB. Diese rief erwartungsgemäß eine Trennung von 7SK RNA und HEXIM1 hervor, jedoch zeigten sich keinerlei Auswirkungen auf die 7SK RNA/LARP7 Interaktion (Abb.: 19). LARP7 scheint somit im Gegensatz zu HEXIM1 und P-TEFb ein konstitutiver Interaktor der 7SK RNA zu sein.

Zum anderen wies bereits die Analyse des 7SK RNP im Dichtegradienten auf eine vollständige Kosedimentation von LARP7 und 7SK RNA hin. Darüber hinaus demonstrieren Daten von He et al., dass eine Depletion von LARP7 ebenfalls eine quantitative Entfernung von 7SK RNA aus dem Extrakt zur Folge hat (He, Jahchan et al. 2008). LARP7 assoziiert daher höchst wahrscheinlich mit der gesamten zellulären 7SK RNA. Infolgedessen stellt daher dieser LARP7/7SK RNA Subkomplex aller Voraussicht nach eine stabile und vorgefertigte Einheit dar, welche die Assoziation mit HEXIM1 regulieren könnte und daher als Basis der 7SK RNP Bildung *in vivo* anzusehen wäre.

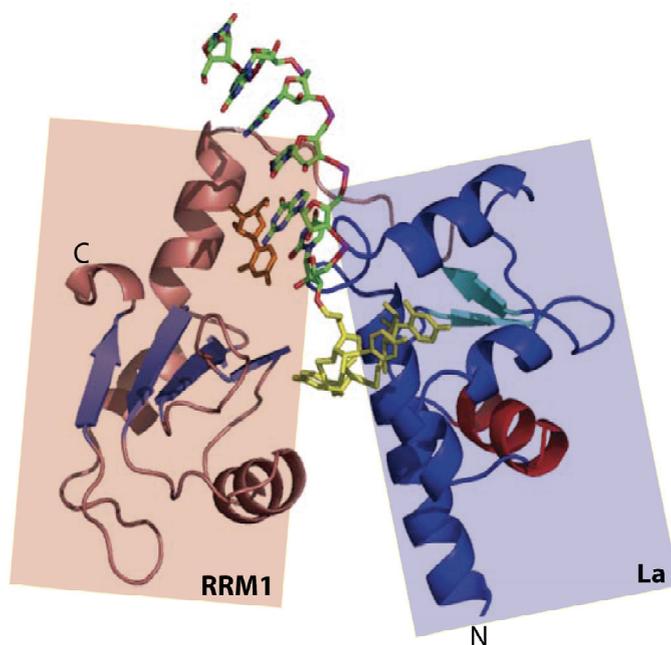
Interessanterweise scheint die Interaktion mit LARP7 ebenso essentiell für die Stabilität der RNA, wie für deren Assoziation mit weiteren Faktoren zu sein. Konsistent mit der Beobachtung, dass die gesamte 7SK RNA an LARP7 gebunden vorliegt, nahm die Stabilität von 7SK RNA parallel zur Reduktion der LARP7 Expression ab (Abb.: 24). Während die Bindung von LARP7 somit das 3'-Ende von 7SK RNA schützt, weisen Studien von Jeronimo et al. darauf hin, dass auch das 5'-Ende der RNA nicht ungeschützt vorliegt (Jeronimo, Forget et al. 2007). Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass die spezifische  $\gamma$ -

Monomethyl-Capstruktur der U6 snRNA bzw. 7SK RNA die Stabilität dieser RNAs wesentlich erhöht (Shumyatsky, Wright et al. 1993). Dieses Cap wird spezifisch durch das *methylphosphate capping enzyme* (MePCE) synthetisiert (Jeronimo, Forget et al. 2007; Krueger, Jeronimo et al. 2008), welches ebenfalls als Komponente des 7SK RNP identifiziert werden konnte (vgl. Abb.: 17). Somit unterstreicht die Tatsache, dass die RNA an beiden Enden durch LARP7 bzw. MePCE vor Abbau geschützt werden muss deren Bedeutung innerhalb der 7SK RNP (Shumyatsky, Wright et al. 1993; Jeronimo, Forget et al. 2007). Zusammengenommen lassen diese Daten daher den Schluss zu, dass die Interaktion von 7SK RNA mit LARP7 die RNA sowohl vor exonukleolytischem Verdau schützt als auch eine notwendige Voraussetzung für deren Bindung an HEXIM1 und P-TEFb ist.

### **6.5 Obwohl La und LARP7 an 7SK RNA binden, wird nur LARP7 in das RNP inkorporiert**

Wie beeinflusst LARP7 die Stabilität von 7SK RNA? LARP7 gehört zur Familie der La ähnlichen Proteine, welche sich durch eine hoch konservierte La-Domäne gefolgt von einer RNA bindenden Domäne auszeichnen und erstmals im humanen La Autoantigen nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise bindet La an alle PolIII transkribierten RNAs und verhindert so deren Degradation. Auf phylogenetischer Ebene erscheint LARP7 als nächster Verwandter von La, sodass mehrere Indizien auf diese beiden Domänen als potentielle 7SK RNA Bindungsmotive in LARP7 hindeuteten (Bousquet-Antonelli and Deragon 2009). Erstens assoziiert das nahe verwandte humane La Protein mit dem 3'-UUU-OH Ende neu synthetisierter PolIII Transkripte (Wolin and Cedervall 2002). Zweitens konnte Teplova et al. nachweisen, dass für diese 3'-UUU-OH Bindung die La- zusammen mit der ersten RRM-Domäne von La notwendig und hinreichend sind (Ohndorf, Steegborn et al. 2001; Maraia and Bayfield 2006; Teplova, Yuan et al. 2006). Dabei trägt die La-Domäne wesentlich zur Erkennung des 3'-UUU-OH Endes bei, während die RRM1 erstaunlicherweise nur einen geringen und atypischen Beitrag, über eine der eigentlichen RNA Bindungsstelle abgewandten Seite, leistet (Teplova, Yuan et al. 2006) (Abb.: 27). Beide Domänen sind in LARP7

stark konserviert und 7SK RNA besitzt als PolIII Transkript ebenfalls ein charakteristisches 3'-UUU-OH Ende (Wassarman and Steitz 1991). Eine erste Bestätigung erfuhr diese Hypothese zunächst anhand von RNA-Bindungsstudien mit LARP7 Deletionsmutanten. Diese legten nahe, dass die Bindung an das 3' RNA Ende in erster Linie den N-Terminus von LARP7 erfordert, welcher die La- und RRM-Domänen enthält. Weitere Hinweise hierfür lieferten Mutationsanalysen der isolierten LARP7 La- und RRM-Domäne. Derartige Mutanten wiesen eine signifikant reduzierte Interaktion mit 7SK RNA auf und beeinträchtigten maßgeblich die 7SK RNP Bildung *in vivo* (He, Jahchan et al. 2008).



**Abbildung 27: Struktur der La- und RRM1-Domäne des humanen La Proteins in Verbindung mit RNA**

Die RRM1-Domäne ist in rot dargestellt, ihre β-Faltblätter in violett. Die drei terminalen Uracil Nucleotide der kokristallisierten UGCUGUUU-OH RNA sind gelb, die restlichen Nucleotide grün. Die Helices der La-Domäne sind blau, die typischerweise Nucleinsäure bindende Helix rot markiert.

Da nach massenspektrometrischer Analyse des 7SK RNP LARP7, nicht jedoch La detektiert werden konnte, erhob sich im gleichen Zug die Fragestellung, wie 7SK RNA/RNP zwischen den einzelnen Proteinen differenziert. Dies scheint umso bemerkenswerter in Anbetracht des hohen Homologiegrades der beiden La- und RRM- Domänen (40% Identität der beiden Domänen von humanem La und LARP7) und der bekannten, direkten Bindung von La an 7SK RNA. Indes deuten mehrere Aspekte darauf hin, dass La zwar initial an 7SK RNA bindet, jedoch sukzessive durch LARP7 ersetzt wird. So zeigten *in vitro* Bindungsstudien, dass bereits die isolierten La- und RRM-Domänen

von LARP7 eine etwa doppelt so hohe Affinität zu 7SK RNA aufweisen wie die des La Proteins (Abb.: 22). Wahrscheinlich erklärt sich dies aufgrund spezifischer Sequenzunterschiede, da sich die Affinität von LARP7 zu 7SK RNA nach Austausch der La- und RRM-Domänen mit denen des La Proteins ebenfalls stark verminderte (He, Jahchan et al. 2008). Während jedoch im rekombinanten System die beiden N-terminalen La- und RRM-Domänen von LARP7 für eine Bindung an 7SK RNA ausreichend zu sein scheinen, spielt hierfür auch die, im humanen La Protein fehlende, C-terminale Region von LARP7 eine wesentliche Rolle (Abb.: 21) (He, Jahchan et al. 2008). Weiterhin wäre es durchaus vorstellbar, dass die Affinität von 7SK RNA zu La bzw. LARP7 auf zellulärer Ebene zusätzlich durch Modifikationen der RNA verändert wird. In Einklang mit dieser Hypothese steht dabei, dass eine Abhängigkeit der La Bindung an einige PolIII Transkripte von verschiedenen posttranskriptionalen Modifikationen beschrieben werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die spezifische  $\gamma$ -Monomethyl-Capstruktur dieser RNAs deren Affinität zu La deutlich verringert, während eine Adenylierung der RNA am 3' terminalen Ende die Bindung an La komplett aufhebt (Chen, Sinha et al. 1998; Sinha, Gu et al. 1998; Chen, Perumal et al. 2000). Interessanterweise werden auch bis zu 70% der zellulären 7SK RNA posttranskriptional adenyliert (Sinha, Gu et al. 1998). Darüber hinaus identifizierte Dong et al. ein in La invariantes und für die Erkennung der 3'-OH Gruppe entscheidendes Aspartat (D33 in hLa), welches in der La-Domäne von LARP7 durch Lysin ersetzt wird (Dong, Chakshusmathi et al. 2004). Folglich ließe sich ein Mechanismus der 7SK RNA/LARP7 Bindung postulieren, nach dem 3' und/oder 5' Modifikationen der RNA die Bindung von La schwächen und somit deren Interaktion mit LARP7 fördern würden. Der C-terminalen LARP7 Region käme dann möglicherweise ein Spezifitätsfunktion zu, welche selektiv die Bindung der N-terminalen Domänen an die prozessierte RNA vermitteln würde. Eine wesentliche Aufgabe zukünftiger Studien wird es daher sein, herauszufinden, inwieweit Modifikationen der RNA, von La oder auch von LARP7 die Interaktion mit 7SK RNA beeinflussen und somit das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver PolII Transkription steuern.

## **6.6 LARP7 reguliert die Transkription viraler und zellulärer PolII Gene *in vivo***

Die Transkription der proviralen HIV-1-DNA in ruhenden T-Zellen spielt eine entscheidende Rolle im Replikationszyklus des HI-Virus und erfordert sowohl zelluläre als auch virale Faktoren. Ein Schlüsselereignis hierbei ist die massive Stimulation der Elongation durch das Zusammenspiel von Tat und P-TEFb. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, konkurriert Tat mit HEXIM1 bzw. BRD4 um die Bindung an CycT1/Cdk9, löst aktiv bestehende 7SK RNP Komplexe auf und rekrutiert P-TEFb so spezifisch an die naszierende TAR-RNA (Yang, Yik et al. 2005; Barboric, Yik et al. 2007). Aufgrund der Abhängigkeit der HIV-1 Transkription von P-TEFb bot dieses System ideale Voraussetzungen für weitere Untersuchungen hinsichtlich einer funktionellen Relevanz von LARP7 für diesen Prozess. Obwohl bereits die Beobachtung, dass Mutationen des LARP7 Gens eine Aktivierung der Transkription *in vivo* hervorrufen (Mori, Sato et al. 2002), eine putative regulatorische Funktion dieses Proteins nahelegte, konnte diese Annahme schließlich anhand von Reporterstudien in TZMbl-Zellen eindeutig belegt werden. So zeigte sich nach Reduktion der LARP7 Expression mittels RNAi ein signifikanter Anstieg der Tat abhängigen Transkription vom HIV-1-LTR-Promotor (Abb.: 23A/B). Eine ähnliche Stimulation der Reporteraktivität ließ sich weder in Abwesenheit von Tat noch LARP7 alleine erkennen, sodass die beobachtete Aktivierung der Transkription vermutlich auf einer gravierenden Störung des 7SK RNP/P-TEFb Verhältnisses durch das Fehlen von LARP7 beruht. In direkter Konsequenz hätte dies eine effektive Zunahme der Menge an freiem P-TEFb und damit einen Anstieg der Transkription zur Folge. Ferner erwies sich die Reduktion von Cdk9 als resistent gegenüber einer Tat vermittelten Transkriptionsaktivierung, was die essentielle Funktion dieser katalytischen P-TEFb Komponente zusätzlich bestätigte. Welche Rolle übernimmt jedoch LARP7 innerhalb dieses Regulationsschemas? Diese Fragestellung gewinnt umso mehr an Bedeutung hinsichtlich der Tatsache, dass LARP7 nicht nur die virale sondern auch die generelle, zelluläre Transkription reprimiert. Hierfür lieferten Real-Time PCR Analysen verschiedener PolII Transkripte aus LARP7 defizienten Zellen

entscheidende Hinweise. HSP70 und TGM2, zwei Gene deren Expression aufgrund ihrer Flavopyridol-Sensitivität als abhängig von P-TEFb beschrieben wurden (Lis, Mason et al. 2000; He, Jahchan et al. 2008), wiesen in diesen Zellen eine vielfach höhere mRNA-Menge auf als in Zellen in denen LARP7 nicht durch RNAi reduziert worden war (Abb.: 24). Nicht weniger interessant erwies sich der Befund, dass die Transkription von Cdk9 nach *knockdown* von LARP7 ebenfalls deutlich anstieg. P-TEFb scheint somit seine eigene Transkription zu regulieren, sodass die resultierende Zunahme der effektiven P-TEFb Menge wahrscheinlich eine Anpassung der Zelle an erhöhte Transkriptionsanforderungen darstellt. Ob andere Faktoren des 7SK RNP unter diesen Bedingungen ebenfalls hochreguliert werden, bleibt jedoch zu untersuchen. Ein *knockdown* von HEXIM1 rief im Gegensatz hierzu eine weit schwächere Stimulation der Transkription hervor, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass dieser Faktor im Kontext des 7SK RNP funktionell durch HEXIM2 ersetzt wird (Byers, Price et al. 2005).

LARP7 scheint somit nicht das Überleben einzelner Zellen, sondern vielmehr deren Wachstums-, und Proliferationstätigkeit zu beeinflussen. Ein möglicher Mechanismus durch den LARP7 die Effizienz der Transkription verändern könnte wäre über die Stabilität von 7SK RNA. Zugunsten dieser Hypothese spräche, dass 7SK RNA quantitativ mit LARP7 assoziiert. Außerdem wird 7SK RNA in Zellen, in denen die Expression von LARP7 mittels RNAi reduziert wurde, ebenso degradiert (vgl. Abb.: 24). Alternativ, jedoch nicht in Widerspruch zu diesem Modell, könnte LARP7 auch an der Auflösung des 7SK RNP und damit an der Regulation der aktiven P-TEFb Menge beteiligt sein. Chen et al. konnte zeigen, dass die Freisetzung von P-TEFb aus dem RNP mit einem Wechsel des Cdk9 Phosphorylierungsmusters einhergeht, wofür sich die Dephosphorylierung von Thr 186 in dessen T-Schleife als entscheidend erwies (Chen, Yang et al. 2004). Möglicherweise wird dieser Vorgang indirekt oder sogar direkt durch LARP7 beeinflusst. Zum einen spräche hierfür die unmittelbare Nähe der Bindungsstellen von LARP7 und P-TEFb an 7SK RNA, sowie die direkte Interaktion von Cdk9 und LARP7 (Egloff, Van Herreweghe et al. 2006). Zum anderen erfordert die Dephosphorylierung von Thr 186 durch PP1 $\alpha$  zuvor eine Umstrukturierung des 7SK RNP. Diese wird durch Dephosphorylierung

einer weiteren Komponente des RNPs mithilfe der Protein-Phosphatase PP2B induziert (Chen, Liu et al. 2008). Obwohl das genaue Substrat von PP2B noch unbekannt ist, besteht jedoch Grund zu der Annahme, dass es sich dabei um LARP7 handeln könnte, welches infolge einer massenspektrometrischen Analyse des Komplexes als mehrfach phosphorylierte Komponente des 7SK RNP nachgewiesen wurde.

Störungen des 7SK RNP/P-TEFb Verhältnisses stehen auch in Zusammenhang mit zahlreichen humanen Erkrankungen, wie Herzmuskel- Hypertrophie oder Krebs und spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle für die intrazelluläre Vermehrung des HI-Virus (Herrmann and Rice 1995; Sano, Abdellatif et al. 2002; Dey, Chao et al. 2007). Interessanterweise legt die Beobachtung, dass LARP7 P-TEFb *in vivo* reprimiert, dieses Protein als mögliches Ziel neuer Therapieansätze nahe. Ähnliche Bestrebungen existieren bereits für HEXIM1, dessen Interaktion mit P-TEFb sich als abhängig von 7SK RNA sowie von LARP7 erwies. Tatsächlich konnten bereits verschiedene Pharmaka, wie HMBA oder SAHA (Suberoylanilid Hydroxamid Säure), identifiziert werden, welche die Assoziation von HEXIM1 mit P-TEFb nachweislich beeinflussen (Dey, Chao et al. 2007; Chen, Liu et al. 2008). Während SAHA eingesetzt wird, um latent HIV infizierte Zellen einer hoch aktiven antiretroviralen Therapie zugänglich zu machen, hemmen andere Therapeutika wie Flavopyridol P-TEFb direkt (Chao and Price 2001; Pumfery, de la Fuente et al. 2006; Contreras, Schwenecker et al. 2009). Substanzen wie DRB oder Actinomycin D scheinen die Aktivität von P-TEFb hingegen über völlig andere Signalkaskaden zu modifizieren (Chen, Liu et al. 2008). Die Aufklärung derjenigen Signalmechanismen, welche die Balance zwischen 7SK RNP und P-TEFb regulieren und somit die Effizienz der PolII Transkription kontrollieren, wird sicherlich zu einem besseren Verständnis der Transkription an sich beitragen und neue Therapieansätze eröffnen.

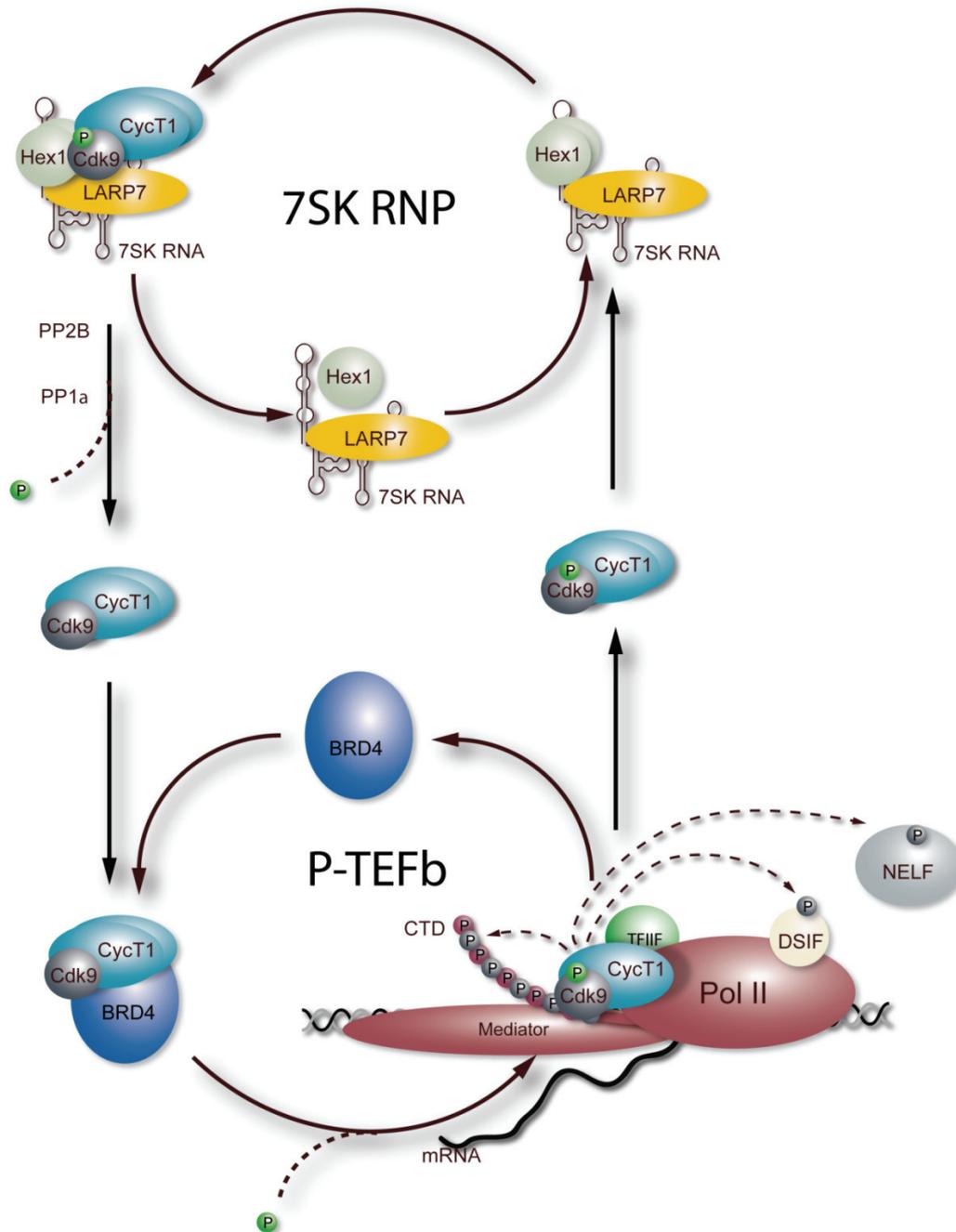
### **6.7 Die Dynamik des 7SK RNP – ein Modell seiner Regulation**

Allein die Tatsache, dass Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen ein empfindliches Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem P-TEFb aufrechterhalten weist auf die

Bedeutung dieser Regulation für zahlreiche zelluläre Prozesse hin. Obwohl hierzu sowohl die differenzielle Expression einzelner P-TEFb Untereinheiten, wie auch deren proteasomaler Abbau beiträgt, wird die Aktivität von P-TEFb jedoch insbesondere durch dessen reversible Assoziation mit HEXIM1 und 7SK RNA bestimmt (Peng, Zhu et al. 1998; Kiernan, Emiliani et al. 2001). Da die Bildung des 7SK RNP trotz des hohen Überschusses an 7SK RNA durch die RNA limitiert wird, schienen zusätzliche 7SK RNA bindende Faktoren diesen Prozeß zu beeinflussen. Diese Beobachtung führte schließlich im Rahmen dieser Arbeit zur Entdeckung des La ähnlichen Proteins LARP7, welches die Stabilität und Integration der RNA in das RNP reguliert. Zusammen mit bereits bekannten Daten ergibt sich somit ein Modell der 7SK RNA abhängigen Regulation der P-TEFb Aktivität (Abb.: 28).

Zunächst stabilisiert die Bindung von La an das 3'-Ende von 7SK RNA diese kurz nach ihrer Synthese durch RNA PolIII. Anschließend führt die Prozessierung der RNA zu einem Austausch von La mit LARP7 und legt so die Basis des 7SK RNP. Die Interaktion zwischen LARP7 und 7SK RNA ist ebenfalls Grundlage für die Bindung von HEXIM1 an das 5'-RNA Ende, woraus schließlich die Bildung eines trimeren HEXIM1/7SK RNA/LARP7 Komplexes resultiert. Dieser Komplex bindet im nächsten Schritt zwei aktive P-TEFb Einheiten und verhindert so deren möglichen Eintritt in eine neue Elongationsphase. Unklar ist allerdings bislang noch, ob es sich hierbei um einen spontanen oder einen regulierten Vorgang handelt. Im Gegensatz dazu unterliegt die Dissoziation des 7SK RNP einer strengen Kontrolle. Durch einen noch nicht näher geklärten Mechanismus induziert die Dephosphorylierung einer Komponente des 7SK RNP durch PP2B Konformationsänderungen innerhalb des Komplexes. Diese strukturelle Reorganisation des RNP exponiert Thr 186 in Cdk9, welches daraufhin durch PP1 $\alpha$  dephosphoryliert wird. Da diese Phosphorylierung essentiell für die Aktivität wie auch die Bindung von P-TEFb an 7SK RNA, HEXIM1 und LARP7 ist, verlässt P-TEFb das RNP und wird mithilfe von BRD4 an die naszierende mRNA rekrutiert. Dort wird Cdk9 durch eine noch unbekannte Kinase wieder reaktiviert und phosphoryliert im Zuge des Eintritts von PolII in die Elongationsphase DSIF, NELF und Ser2 der PolII CTD. 7SK RNA hingegen bleibt nach der Auflösung des RNP stabil

mit LARP7 assoziiert und steht so für eine erneute Bindung an P-TEFb unmittelbar zur Verfügung.



**Abbildung 28: Schematische Darstellung der Regulation des 7SK RNP**

LARP7 bindet das 3'-Ende von 7SK RNA und ermöglicht somit die Bindung von HEXIM1 an deren 5'-Schleife. Dieser trimere Komplex rekrutiert daraufhin zwei aktive P-TEFb Einheiten und inhibiert so deren weitere Aktivität. Steigt der Bedarf an P-TEFb wieder, werden auf noch unbekanntem Weg die beiden Phosphatasen PP2B und PP1a aktiviert, wobei letztere nach einer Konformationsänderung des RNP Thr 186 in Cdk9 dephosphoryliert und so die Dissoziation von P-

TEFb induziert. Anschließend wird P-TEFb durch BRD4 an die PolIII CTD transportiert und stimuliert dort die mRNA Synthese. 7SK RNA hingegen bleibt nach der Auflösung des RNP stabil mit LARP7 assoziiert und steht so für eine erneute Bindung an P-TEFb unmittelbar zur Verfügung.

Dieses Modell gewährt einen ersten Einblick in die Regulation der 7SK RNP Bildung durch das La ähnliche Protein LARP7, lässt jedoch die Frage unbeantwortet, ob hieran weitere 7SK RNA bindende Faktoren wie MePCE oder hnRNP A1 beteiligt sind. Obwohl beispielsweise hnRNP A1 und HEXIM1 bzw. P-TEFb unterschiedliche Sequenzelemente der RNA binden, existieren der hnRNPA1-Komplex und das 7SK RNP jedoch völlig getrennt voneinander (Van Herreweghe, Egloff et al. 2007). hnRNP Proteine beeinflussen die Faltung von RNAs und damit deren Interaktion mit anderen Proteinen. Daher hätte eine kontrollierte Assoziation mit hnRNPs wahrscheinlich eine Umstrukturierung, möglicherweise sogar eine Auflösung des 7SK RNP zur Folge. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass ein 7SK RNP Komplex, welchem die Fähigkeit hnRNP A1 zu binden fehlt, gegenüber Stress induzierenden Agenzien offensichtlich resistent ist (Van Herreweghe, Egloff et al. 2007). Dies wiederum erlaubt die interessante Spekulation, dass LARP7, als gemeinsame Komponente beider Komplexe, die Interaktion von hnRNP A1 mit der RNA regulieren und damit zur Auflösung des 7SK RNP bzw. zur Aktivierung von P-TEFb beitragen könnte. Darüber hinaus scheinen weitere hnRNP Proteine sowie die RNA Helikase A mit dem hnRNP A1/7SK RNA/LARP7 RNP zu interagieren, was dieser Theorie zusätzlich Nachdruck verleiht (Van Herreweghe, Egloff et al. 2007).

hnRNP-Proteine assoziieren ebenfalls mit PolIII transkribierten, nicht kodierenden Y-RNAs. Diese Interaktion bedarf jedoch der Hilfe eines weiteren Faktors, welcher sich mit La als enger Verwandter von LARP7 herausstellte (Belisova, Semrad et al. 2005). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass La dabei die Rolle eines RNA-Chaperons übernimmt, welches die korrekte Faltung der Y-RNA und somit die Bindung der hnRNP Proteine unterstützt (Fabini, Rajmakers et al. 2001; Belisova, Semrad et al. 2005). Allem Anschein nach definiert daher die individuelle Struktur der RNA die Art und Anzahl ihrer Bindungspartner. Insofern drängt sich der Gedanke auf, dass die dynamische Struktur des 7SK RNP und damit die Menge an aktivem P-TEFb in ähnlicher Weise durch LARP7 beeinflusst werden könnte.

Anzunehmen ist jedoch, dass mehrere unabhängige Mechanismen existieren, um eine derart wichtige Funktion wie die Aktivität des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb zu regulieren (Krueger, Jeronimo et al. 2008). Es bleibt daher abzuwarten wie diese unterschiedlichen Signale letztendlich dazu beitragen, ein dynamisches P-TEFb Gleichgewicht in der Zelle aufrechtzuerhalten.

## 6.8 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse lieferten erstmals Aufschluß über die 7SK RNA abhängige Regulation der PolII Transkription durch das La ähnliche Protein LARP7. LARP7 bindet direkt an 7SK RNA und beeinflusst so die Aktivität des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb. Abgesehen vom prototypischen La Protein, welches sowohl an der Translation, sowie an der Termination und Stabilisierung von PolIII Transkripten beteiligt zu sein scheint, ist LARP7 somit das bislang einzig bekannte La ähnliche Protein mit einer klar definierten Funktion. Nichtsdestotrotz scheint die La-Domäne als gemeinsames Merkmal aller LARPs eine generelle Affinität zu Pyrimidin-reicher RNA aufzuweisen, deren jeweilige Spezifität durch die individuelle C-terminale Struktur des Proteins bestimmt wird. Die Beobachtung, dass La nur in einem frühen Reifungsstadium an 7SK RNA bindet und in dessen Verlauf durch LARP7 ersetzt wird, unterstützt diese Hypothese. Weitere Studien werden zeigen, ob es sich hierbei nicht sogar um einen generellen Mechanismus handelt, durch den La ähnliche Proteine unterschiedliche PolIII Transkripte spezifischen Wegen oder Funktionen zuführen könnten.

Interessanterweise ist die Kontrolle der Transkriptionselongation durch P-TEFb von Hefe bis Mensch weitgehend konserviert, jedoch scheint die Art und Weise ihrer Regulation durch das 7SK RNP nur in Vertebraten aufzutreten (Peterlin and Price 2006). Allerdings offenbart eine vergleichende phylogenetische Analyse verschiedener 7SK RNP Komponenten Ähnlichkeiten von LARP7 mit dem *D. melanogaster* Protein mxc, welches ebenfalls als Tumorsuppressor diskutiert wird (Abb.: 29) (Santamaria and Randsholt 1995). Obwohl es zudem erste Hinweise auf die Existenz einer 7SK homologen RNA auch in *Drosophila*

gibt, scheint mxc im Gegensatz zu LARP7 nicht direkt mit RNA zu interagieren. Möglicherweise nutzen Arthropoden somit einen unterschiedlichen Weg, um die Aktivität von P-TEFb zu kontrollieren. Die Zukunft wird zeigen, ob die Regulation der Transkription durch kleine RNAs tatsächlich einen neuen Mechanismus darstellt oder ob dieser evolutiv konserviert ist. Letzteres legt zumindest die kürzlich entdeckte Vielfalt an nicht kodierenden RNAs mit einer Rolle in der Regulation der PolII Transkription nahe (Goodrich and Kugel 2006; Barrandon, Spiluttini et al. 2008).

	P-TEFb				DSIF		NELF			HEXIM		7SK	LARP7	
	Cdk9	CycT1	CycT2	CycK	Spt4	Spt5	a	b	c/d	e	1	2		
# Reste	372	726	730	354	1087	117	528	580	590	380	359	286	331	589
<i>h. sapiens</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>d. rerio</i>	95	69	67	84	94	97	81	91	95	77	38	33	88	59
<i>d. melanogaster</i>	84	55	55	70	73	82	66	72	77	47	31	38	+	34
<i>s. purpuratus</i>	69	50	47	70	+	82	+	76	75	35	36	42	-	-
<i>c. elegans</i>	74	38	32	45	64	78	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>s. cerevisiae</i>	60	<25	<25	-	43	55	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>s. pombe</i>	62	<25	<25	-	48	54	-	-	-	-	-	-	-	-

**Abbildung 29: Phylogenetische Analyse von Transkriptionselongations-Kontrollfaktoren.**

Die Sequenzen der jeweiligen Proteine stehen im Vergleich zu den humanen Sequenzen. (Abbildung modifiziert übernommen aus (Peterlin and Price 2006) Abkürzungen: - , nicht gefunden; + , gefunden, jedoch keine ausreichenden Daten für einen Vergleich vorhanden.



---

## 7 Literaturverzeichnis

- Adamson, T. E., D. C. Shutt, et al. (2005). "Functional coupling of cleavage and polyadenylation with transcription of mRNA." J Biol Chem **280**(37): 32262-71.
- Ahn, S. H., M. Kim, et al. (2004). "Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing." Mol Cell **13**(1): 67-76.
- Ai, L., W. J. Kim, et al. (2008). "The transglutaminase 2 gene (TGM2), a potential molecular marker for chemotherapeutic drug sensitivity, is epigenetically silenced in breast cancer." Carcinogenesis **29**(3): 510-8.
- Alam, J. and J. L. Cook (1990). "Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription." Anal Biochem **188**(2): 245-54.
- Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." Nature **226**(5252): 1209-11.
- Barboric, M., J. Kohoutek, et al. (2005). "Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb." Embo J **24**(24): 4291-303.
- Barboric, M., R. M. Nissen, et al. (2001). "NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II." Mol Cell **8**(2): 327-37.
- Barboric, M. and B. M. Peterlin (2005). "A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation." PLoS Biol **3**(2): e76.
- Barboric, M., J. H. Yik, et al. (2007). "Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription." Nucleic Acids Res **35**(6): 2003-12.
- Barboric, M., F. Zhang, et al. (2005). "Ubiquitylation of Cdk9 by Skp2 facilitates optimal Tat transactivation." J Virol **79**(17): 11135-41.
- Barrandon, C., F. Bonnet, et al. (2007). "The transcription-dependent dissociation of P-TEFb-HEXIM1-7SK RNA relies upon formation of hnRNP-7SK RNA complexes." Mol Cell Biol **27**(20): 6996-7006.
- Barrandon, C., B. Spiluttini, et al. (2008). "Non-coding RNAs regulating the transcriptional machinery." Biol Cell **100**(2): 83-95.
- Belisova, A., K. Semrad, et al. (2005). "RNA chaperone activity of protein components of human Ro RNPs." Rna **11**(7): 1084-94.

## Literaturverzeichnis

---

- Biberman, Y. and O. Meyuhas (1999). "TOP mRNAs are translationally inhibited by a titratable repressor in both wheat germ extract and reticulocyte lysate." FEBS Lett **456**(3): 357-60.
- Bieniasz, P. D., T. A. Grdina, et al. (1998). "Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat." Embo J **17**(23): 7056-65.
- Bird, G., D. A. Zorio, et al. (2004). "RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation." Mol Cell Biol **24**(20): 8963-9.
- Blazek, D., M. Barboric, et al. (2005). "Oligomerization of HEXIM1 via 7SK snRNA and coiled-coil region directs the inhibition of P-TEFb." Nucleic Acids Res **33**(22): 7000-10.
- Borukhov, S. and E. Nudler (2008). "RNA polymerase: the vehicle of transcription." Trends Microbiol **16**(3): 126-34.
- Bousquet-Antonelli, C. and J. M. Deragon (2009). "A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily." Rna **15**(5): 750-64.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Bres, V., N. Gomes, et al. (2005). "A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat." Genes Dev **19**(10): 1211-26.
- Bronstein, I., J. Fortin, et al. (1994). "Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays." Anal Biochem **219**(2): 169-81.
- Brown, C. E., T. Lechner, et al. (2000). "The many HATs of transcription coactivators." Trends Biochem Sci **25**(1): 15-9.
- Byers, S. A., J. P. Price, et al. (2005). "HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK." J Biol Chem **280**(16): 16360-7.
- Cardinali, B., C. Carissimi, et al. (2003). "La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes." J Biol Chem **278**(37): 35145-51.
- Casse, C., F. Giannoni, et al. (1999). "The transcriptional inhibitors, actinomycin D and alpha-amanitin, activate the HIV-1 promoter and favor phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain." J Biol Chem **274**(23): 16097-106.
- Chao, S. H. and D. H. Price (2001). "Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo." J Biol Chem **276**(+34): 31793-9.

- Chen, R., M. Liu, et al. (2008). "PP2B and PP1alpha cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca<sup>2+</sup> signaling." Genes Dev **22**(10): 1356-68.
- Chen, R., Z. Yang, et al. (2004). "Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA." J Biol Chem **279**(6): 4153-60.
- Chen, Y., K. Perumal, et al. (2000). "Inhibition of translation of mRNAs containing gamma-monomethylphosphate cap structure in frog oocytes and in mammalian cells." Gene Expr **9**(3): 133-43.
- Chen, Y., K. Sinha, et al. (1998). "Accurate 3' end processing and adenylation of human signal recognition particle RNA and alu RNA in vitro." J Biol Chem **273**(52): 35023-31.
- Cheng, B. and D. H. Price (2008). "Analysis of factor interactions with RNA polymerase II elongation complexes using a new electrophoretic mobility shift assay." Nucleic Acids Res.
- Chodosh, L. A., A. Fire, et al. (1989). "5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro." J Biol Chem **264**(4): 2250-7.
- Cmarko, D., P. J. Verschure, et al. (1999). "Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection." Mol Biol Cell **10**(1): 211-23.
- Contreras, X., M. Barboric, et al. (2007). "HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription." PLoS Pathog **3**(10): 1459-69.
- Contreras, X., M. Schwenker, et al. (2009). "Suberoylanilide hydroxamic acid reactivates HIV from latently infected cells." J Biol Chem **284**(11): 6782-9.
- Cramer, P. (2004). "RNA polymerase II structure: from core to functional complexes." Curr Opin Genet Dev **14**(2): 218-26.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, et al. (2001). "Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution." Science **292**(5523): 1863-76.
- Crick, F. H. (1958). "On protein synthesis." Symp Soc Exp Biol **12**: 138-63.
- Cullen, B. R. (1995). "Regulation of HIV gene expression." Aids **9 Suppl A**: S19-32.
- Dames, S. A., A. Schonichen, et al. (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**(36): 14312-7.

- Dey, A., S. H. Chao, et al. (2007). "HEXIM1 and the control of transcription elongation: from cancer and inflammation to AIDS and cardiac hypertrophy." Cell Cycle **6**(15): 1856-63.
- Dey, A., F. Chitsaz, et al. (2003). "The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8758-63.
- Dey, A., J. Ellenberg, et al. (2000). "A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition." Mol Cell Biol **20**(17): 6537-49.
- Dong, G., G. Chakshumathi, et al. (2004). "Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch." Embo J **23**(5): 1000-7.
- Dulac, C., A. A. Michels, et al. (2005). "Transcription-dependent association of multiple positive transcription elongation factor units to a HEXIM multimer." J Biol Chem **280**(34): 30619-29.
- Dvir, A. (2002). "Promoter escape by RNA polymerase II." Biochim Biophys Acta **1577**(2): 208-223.
- Edwards, M. C., C. Wong, et al. (1998). "Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity." Mol Cell Biol **18**(7): 4291-300.
- Egloff, S., E. Van Herreweghe, et al. (2006). "Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding." Mol Cell Biol **26**(2): 630-42.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Fabini, G., R. Raijmakers, et al. (2001). "The heterogeneous nuclear ribonucleoproteins I and K interact with a subset of the ro ribonucleoprotein-associated Y RNAs in vitro and in vivo." J Biol Chem **276**(23): 20711-8.
- Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Annu Rev Biochem **67**: 1-25.
- Frith, M. C., M. Pheasant, et al. (2005). "The amazing complexity of the human transcriptome." Eur J Hum Genet **13**(8): 894-7.
- Fu, J., H. G. Yoon, et al. (2007). "Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation." Mol Cell Biol **27**(13): 4641-51.
- Fu, T. J., J. Peng, et al. (1999). "Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription." J Biol Chem **274**(49): 34527-30.

- Fujinaga, K., D. Irwin, et al. (2004). "Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element." Mol Cell Biol **24**(2): 787-95.
- Garber, M. E., T. P. Mayall, et al. (2000). "CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA." Mol Cell Biol **20**(18): 6958-69.
- Garber, M. E., P. Wei, et al. (1998). "HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **63**: 371-80.
- Garber, M. E., P. Wei, et al. (1998). "The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein." Genes Dev **12**(22): 3512-27.
- Garriga, J., J. Peng, et al. (1998). "Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation." Oncogene **17**(24): 3093-102.
- Gomes, N. P., G. Bjerke, et al. (2006). "Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program." Genes Dev **20**(5): 601-12.
- Goodrich, J. A. and J. F. Kugel (2006). "Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(8): 612-6.
- Grana, X., A. De Luca, et al. (1994). "PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3834-8.
- Green, M. R. (2005). "Eukaryotic transcription activation: right on target." Mol Cell **18**(4): 399-402.
- Gultekin, H. and K. H. Heermann (1988). "The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix." Anal Biochem **172**(2): 320-9.
- Gupta, S., R. K. Busch, et al. (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**(31): 19137-42.
- Gussow, D. and T. Clackson (1989). "Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction." Nucleic Acids Res **17**(10): 4000.
- Haaland, R. E., C. H. Herrmann, et al. (2003). "Increased association of 7SK snRNA with Tat cofactor P-TEFb following activation of peripheral blood lymphocytes." Aids **17**(17): 2429-36.

- Haaland, R. E., C. H. Herrmann, et al. (2005). "siRNA depletion of 7SK snRNA induces apoptosis but does not affect expression of the HIV-1 LTR or P-TEFb-dependent cellular genes." J Cell Physiol **205**(3): 463-70.
- Hahn, S. (2004). "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery." Nat Struct Mol Biol **11**(5): 394-403.
- Hamilton, T. L., M. Stoneley, et al. (2006). "TOPs and their regulation." Biochem Soc Trans **34**(Pt 1): 12-6.
- Hanahan, D. and M. Meselson (1983). "Plasmid screening at high colony density." Methods Enzymol **100**: 333-42.
- Hartmuth, K., H. Urlaub, et al. (2002). "Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16719-24.
- Hartzog, G. A., T. Wada, et al. (1998). "Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **12**(3): 357-69.
- Hattori, M. (2005). "[Finishing the euchromatic sequence of the human genome]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **50**(2): 162-8.
- He, N., N. S. Jahchan, et al. (2008). "A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis." Mol Cell **29**(5): 588-99.
- Herrmann, C. H. and M. A. Mancini (2001). "The Cdk9 and cyclin T subunits of TAK/P-TEFb localize to splicing factor-rich nuclear speckle regions." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1491-503.
- Herrmann, C. H. and A. P. Rice (1993). "Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase." Virology **197**(2): 601-8.
- Herrmann, C. H. and A. P. Rice (1995). "Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor." J Virol **69**(3): 1612-20.
- Hieb, A. R., S. Baran, et al. (2006). "An 8 nt RNA triggers a rate-limiting shift of RNA polymerase II complexes into elongation." Embo J **25**(13): 3100-9.
- Houzelstein, D., S. L. Bullock, et al. (2002). "Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4." Mol Cell Biol **22**(11): 3794-802.
- Howe, L., C. E. Brown, et al. (1999). "Histone acetyltransferase complexes and their link to transcription." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **9**(3-4): 231-43.

- Isel, C. and J. Karn (1999). "Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation." J Mol Biol **290**(5): 929-41.
- Ivanov, D., Y. T. Kwak, et al. (2000). "Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties." Mol Cell Biol **20**(9): 2970-83.
- Ivanov, D., Y. T. Kwak, et al. (1999). "Cyclin T1 domains involved in complex formation with Tat and TAR RNA are critical for tat-activation." J Mol Biol **288**(1): 41-56.
- Jang, M. K., K. Mochizuki, et al. (2005). "The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription." Mol Cell **19**(4): 523-34.
- Jeanmougin, F., J. M. Wurtz, et al. (1997). "The bromodomain revisited." Trends Biochem Sci **22**(5): 151-3.
- Jerónimo, C., D. Forget, 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**(2): 262-74.
- Jiang, Y. W., P. Veschambre, et al. (1998). "Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8538-43.
- Jones, K. A. (1997). "Taking a new TAK on tat transactivation." Genes Dev **11**(20): 2593-9.
- Jones, K. A. and B. M. Peterlin (1994). "Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter." Annu Rev Biochem **63**: 717-43.
- Kadonaga, J. T. (2004). "Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors." Cell **116**(2): 247-57.
- Kanazawa, S., T. Okamoto, et al. (2000). "Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection." Immunity **12**(1): 61-70.
- Kanazawa, S., L. Soucek, et al. (2003). "c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis." Oncogene **22**(36): 5707-11.
- Kanno, T., Y. Kanno, et al. (2004). "Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells." Mol Cell **13**(1): 33-43.
- Kao, S. Y., A. F. Calman, et al. (1987). "Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product." Nature **330**(6147): 489-93.
- Karn, J. (1999). "Tackling Tat." J Mol Biol **293**(2): 235-54.

- Kephart, D. D., N. F. Marshall, et al. (1992). "Stability of Drosophila RNA polymerase II elongation complexes in vitro." Mol Cell Biol **12**(5): 2067-77.
- Kiernan, R. E., S. Emiliani, et al. (2001). "Interaction between cyclin T1 and SCF(SKP2) targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome." Mol Cell Biol **21**(23): 7956-70.
- Kim, J. B. and P. A. Sharp (2001). "Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase." J Biol Chem **276**(15): 12317-23.
- Kim, J. B., Y. Yamaguchi, et al. (1999). "Tat-SF1 protein associates with RAP30 and human SPT5 proteins." Mol Cell Biol **19**(9): 5960-8.
- Kim, Y. K., C. F. Bourgeois, et al. (2002). "Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation." Mol Cell Biol **22**(13): 4622-37.
- Knezetic, J. A. and D. S. Luse (1986). "The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro." Cell **45**(1): 95-104.
- Komarnitsky, P., E. J. Cho, et al. (2000). "Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription." Genes Dev **14**(19): 2452-60.
- Kornberg, R. D. and J. O. Thomas (1974). "Chromatin structure; oligomers of the histones." Science **184**(139): 865-8.
- Kroiss, M., J. Schultz, et al. (2008). "Evolution of an RNP assembly system: a minimal SMN complex facilitates formation of UsnRNPs in Drosophila melanogaster." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10045-50.
- Krueger, B. J., C. Jeronimo, 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**(7): 2219-29.
- Ladurner, A. G., C. Inouye, et al. (2003). "Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries." Mol Cell **11**(2): 365-76.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lerner, M. R. and J. A. Steitz (1979). "Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5495-9.
- Lerner, M. R. and J. A. Steitz (1981). "Snurps and scyrps." Cell **25**(2): 298-300.

- Levy, S., D. Avni, et al. (1991). "Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3319-23.
- Li, B., M. Carey, et al. (2007). "The role of chromatin during transcription." Cell **128**(4): 707-19.
- Li, Q., J. J. Cooper, et al. (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**(8): 2503-12.
- Li, Q., J. P. Price, et al. (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**(31): 28819-26.
- Lin, P. S., N. F. Marshall, et al. (2002). "CTD phosphatase: role in RNA polymerase II cycling and the regulation of transcript elongation." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **72**: 333-65.
- Lis, J. (1998). "Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **63**: 347-56.
- Lis, J. T., P. Mason, et al. (2000). "P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci." Genes Dev **14**(7): 792-803.
- Malone, E. A., J. S. Fassler, et al. (1993). "Molecular and genetic characterization of SPT4, a gene important for transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **237**(3): 449-59.
- Maraia, R. J. and M. A. Bayfield (2006). "The La protein-RNA complex surfaces." Mol Cell **21**(2): 149-52.
- Marks, P. A., V. M. Richon, et al. (1994). "Inducing differentiation of transformed cells with hybrid polar compounds: a cell cycle-dependent process." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10251-4.
- Marshall, N. F., J. Peng, et al. (1996). "Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase." J Biol Chem **271**(43): 27176-83.
- Marshall, N. F. and D. H. Price (1992). "Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes." Mol Cell Biol **12**(5): 2078-90.
- Marshall, N. F. and D. H. Price (1995). "Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation." J Biol Chem **270**(21): 12335-8.
- Matangkasombut, O. and S. Buratowski (2003). "Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation." Mol Cell **11**(2): 353-63.

- Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2006). "Non-coding RNA." Hum Mol Genet **15 Spec No 1**: R17-29.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II." Genes Dev **11**(24): 3306-18.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription." Nature **385**(6614): 357-61.
- Medlin, J., A. Scurry, et al. (2005). "P-TEFb is not an essential elongation factor for the intronless human U2 snRNA and histone H2b genes." Embo J **24**(23): 4154-65.
- Mehta, K., J. Fok, et al. (2004). "Prognostic significance of tissue transglutaminase in drug resistant and metastatic breast cancer." Clin Cancer Res **10**(23): 8068-76.
- Meinhart, A., T. Kamenski, et al. (2005). "A structural perspective of CTD function." Genes Dev **19**(12): 1401-15.
- Merril, C. R., M. L. Dunau, et al. (1981). "A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels." Anal Biochem **110**(1): 201-7.
- Meyuhas, O. (2000). "Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level." Eur J Biochem **267**(21): 6321-30.
- Michels, A. A., A. Fraldi, et al. (2004). "Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor." Embo J **23**(13): 2608-19.
- Michels, A. A., V. T. Nguyen, et al. (2003). "MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner." Mol Cell Biol **23**(14): 4859-69.
- Milligan, J. F. and O. C. Uhlenbeck (1989). "Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase." Methods Enzymol **180**: 51-62.
- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-4.
- Mori, Y., F. Sato, et al. (2002). "Instabilotyping reveals unique mutational spectra in microsatellite-unstable gastric cancers." Cancer Res **62**(13): 3641-5.
- Murphy, S., C. Di Liegro, et al. (1987). "The in vitro transcription of the 7SK RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of an upstream promoter." Cell **51**(1): 81-7.
- Myers, L. C. and R. D. Kornberg (2000). "Mediator of transcriptional regulation." Annu Rev Biochem **69**: 729-49.

- Naar, A. M., B. D. Lemon, et al. (2001). "Transcriptional coactivator complexes." Annu Rev Biochem **70**: 475-501.
- Napolitano, G., P. Licciardo, et al. (1999). "The CDK9-associated cyclins T1 and T2 exert opposite effects on HIV-1 Tat activity." Aids **13**(12): 1453-9.
- Narita, T., Y. Yamaguchi, et al. (2003). "Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex." Mol Cell Biol **23**(6): 1863-73.
- Narlikar, G. J., H. Y. Fan, et al. (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." Cell **108**(4): 475-87.
- Neubauer, G., A. King, et al. (1998). "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex." Nat Genet **20**(1): 46-50.
- Nguyen, V. T., T. Kiss, et al. (2001). "7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes." Nature **414**(6861): 322-5.
- Ni, Z., B. E. Schwartz, et al. (2004). "Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes." Mol Cell **13**(1): 55-65.
- Ohndorf, U. M., C. Steegborn, et al. (2001). "Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity." J Biol Chem **276**(29): 27188-96.
- Orphanides, G., T. Lagrange, et al. (1996). "The general transcription factors of RNA polymerase II." Genes Dev **10**(21): 2657-83.
- Ouchida, R., M. Kusahara, et al. (2003). "Suppression of NF-kappaB-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells." Genes Cells **8**(2): 95-107.
- Pal, M. and D. S. Luse (2003). "The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5700-5.
- Palangat, M., D. B. Renner, et al. (2005). "A negative elongation factor for human RNA polymerase II inhibits the anti-arrest transcript-cleavage factor TFIIS." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15036-41.
- Pang, K. C., S. Stephen, et al. (2005). "RNAdb--a comprehensive mammalian noncoding RNA database." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D125-30.

- Parada, C. A. and R. G. Roeder (1999). "A novel RNA polymerase II-containing complex potentiates Tat-enhanced HIV-1 transcription." Embo J **18**(13): 3688-701.
- Pei, Y., B. Schwer, et al. (2003). "Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control." J Biol Chem **278**(9): 7180-8.
- Pellizzoni, L., B. Cardinali, et al. (1996). "A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: implication of a protein factor in complex formation." J Mol Biol **259**(5): 904-15.
- Peng, J., N. F. Marshall, et al. (1998). "Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb." J Biol Chem **273**(22): 13855-60.
- Peng, J., Y. Zhu, et al. (1998). "Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb." Genes Dev **12**(5): 755-62.
- Peterlin, B. M. and D. H. Price (2006). "Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb." Mol Cell **23**(3): 297-305.
- Peterlin, B. M. and D. Trono (2003). "Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication." Nat Rev Immunol **3**(2): 97-107.
- Pikaard, C. S., J. R. Haag, et al. (2008). "Roles of RNA polymerase IV in gene silencing." Trends Plant Sci **13**(7): 390-7.
- Ping, Y. H. and T. M. Rana (1999). "Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes." J Biol Chem **274**(11): 7399-404.
- Prelich, G. (2002). "RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: emerging clues to their function." Eukaryot Cell **1**(2): 153-62.
- Price, D. H. (2000). "P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II." Mol Cell Biol **20**(8): 2629-34.
- Proudfoot, N. J., A. Furger, et al. (2002). "Integrating mRNA processing with transcription." Cell **108**(4): 501-12.
- Pumfery, A., C. de la Fuente, et al. (2006). "Potential use of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors as anti-HIV therapeutics." Curr Pharm Des **12**(16): 1949-61.
- Raschke, E. E., T. Albert, et al. (1999). "Transcriptional regulation of the Ig kappa gene by promoter-proximal pausing of RNA polymerase II." J Immunol **163**(8): 4375-82.

- Remillieux-Leschelle, N., P. Santamaria, et al. (2002). "Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene." Genetics **162**(3): 1259-74.
- Renner, D. B., Y. Yamaguchi, et al. (2001). "A highly purified RNA polymerase II elongation control system." J Biol Chem **276**(45): 42601-9.
- Rodriguez, C. R., E. J. Cho, et al. (2000). "Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II." Mol Cell Biol **20**(1): 104-12.
- Rougvie, A. E. and J. T. Lis (1988). "The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged." Cell **54**(6): 795-804.
- Rougvie, A. E. and J. T. Lis (1990). "Postinitiation transcriptional control in *Drosophila melanogaster*." Mol Cell Biol **10**(11): 6041-5.
- Russo, A. A., P. D. Jeffrey, et al. (1996). "Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation." Nat Struct Biol **3**(8): 696-700.
- Saget, O., F. Forquignon, et al. (1998). "Needs and targets for the multi sex combs gene product in *Drosophila melanogaster*." Genetics **149**(4): 1823-38.
- Sanders, S. L., J. Jennings, et al. (2002). "Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry." Mol Cell Biol **22**(13): 4723-38.
- Sano, M., M. Abdellatif, et al. (2002). "Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy." Nat Med **8**(11): 1310-7.
- Santamaria, P. and N. B. Randsholt (1995). "Characterization of a region of the X chromosome of *Drosophila* including multi sex combs (mxc), a Polycomb group gene which also functions as a tumour suppressor." Mol Gen Genet **246**(3): 282-90.
- Saunders, A., L. J. Core, et al. (2006). "Breaking barriers to transcription elongation." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(8): 557-67.
- Schulte, A., N. Czudnochowski, et al. (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**(26): 24968-77.
- Sedore, S. C., S. A. Byers, et al. (2007). "Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR." Nucleic Acids Res **35**(13): 4347-58.

## Literaturverzeichnis

---

- Sehgal, P. B., J. E. Darnell, Jr., et al. (1976). "The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells." Cell **9**(3): 473-80.
- Shevchenko, A., M. Wilm, et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." Anal Chem **68**(5): 850-8.
- Shim, E. Y., A. K. Walker, et al. (2002). "CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo." Genes Dev **16**(16): 2135-46.
- Shore, S. M., S. A. Byers, et al. (2003). "Identification of a novel isoform of Cdk9." Gene **307**: 175-82.
- Shumyatsky, G., D. Wright, et al. (1993). "Methylphosphate cap structure increases the stability of 7SK, B2 and U6 small RNAs in *Xenopus* oocytes." Nucleic Acids Res **21**(20): 4756-61.
- Shumyatsky, G. P., S. V. Tillib, et al. (1990). "B2 RNA and 7SK RNA, RNA polymerase III transcripts, have a cap-like structure at their 5' end." Nucleic Acids Res **18**(21): 6347-51.
- Sims, R. J., 3rd, R. Belotserkovskaya, et al. (2004). "Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it." Genes Dev **18**(20): 2437-68.
- Sinha, K. M., J. Gu, et al. (1998). "Adenylation of small RNAs in human cells. Development of a cell-free system for accurate adenylation on the 3'-end of human signal recognition particle RNA." J Biol Chem **273**(12): 6853-9.
- Svejstrup, J. Q., P. Vichi, et al. (1996). "The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH." Trends Biochem Sci **21**(9): 346-50.
- Swanson, M. S., E. A. Malone, et al. (1991). "SPT5, an essential gene important for normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes an acidic nuclear protein with a carboxy-terminal repeat." Mol Cell Biol **11**(8): 4286.
- Szell, M., Z. Bata-Csorgo, et al. (2008). "The enigmatic world of mRNA-like ncRNAs: their role in human evolution and in human diseases." Semin Cancer Biol **18**(2): 141-8.
- Taft, R. J., M. Pheasant, et al. (2007). "The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity." Bioessays **29**(3): 288-99.
- Tang, H., K. L. Kuhen, et al. (1999). "Lentivirus replication and regulation." Annu Rev Genet **33**: 133-70.
- Taube, R., K. Fujinaga, et al. (1999). "Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation." Virology **264**(2): 245-53.

- Taube, R., X. Lin, et al. (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**(1): 321-31.
- Temin, H. M. and S. Mizutani (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." Nature **226**(5252): 1211-3.
- Teplova, M., Y. R. Yuan, et al. (2006). "Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen." Mol Cell **21**(1): 75-85.
- Thomas, M. C. and C. M. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(3): 105-78.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Ujvari, A. and D. S. Luse (2006). "RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 49-54.
- Valerie, K., A. Delers, et al. (1988). "Activation of human immunodeficiency virus type 1 by DNA damage in human cells." Nature **333**(6168): 78-81.
- Van Herreweghe, E., S. Egloff, et al. (2007). "Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb." Embo J **26**(15): 3570-80.
- Wada, T., T. Takagi, 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**(3): 343-56.
- Wang, W., M. Carey, et al. (1992). "Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening." Science **255**(5043): 450-3.
- Wang, Y. and R. R. Rando (1995). "Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA." Chem Biol **2**(5): 281-90.
- Wassarman, D. A. and J. A. Steitz (1991). "Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein (RNP), the most abundant human small RNP of unknown function." Mol Cell Biol **11**(7): 3432-45.
- Wei, P., M. E. Garber, et al. (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**(4): 451-62.
- Wen, Y. and A. J. Shatkin (1999). "Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping." Genes Dev **13**(14): 1774-9.

- Westover, K. D., D. A. Bushnell, et al. (2004). "Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II." Science **303**(5660): 1014-6.
- Wierzbicki, A. T., J. R. Haag, et al. (2008). "Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes." Cell **135**(4): 635-48.
- Wimmer, J., K. Fujinaga, et al. (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**(1): 182-9.
- Wolin, S. L. and T. Cedervall (2002). "The La protein." Annu Rev Biochem **71**: 375-403.
- Wu, S. Y. and C. M. Chiang (2007). "The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation." J Biol Chem **282**(18): 13141-5.
- Yamada, T., Y. Yamaguchi, et al. (2006). "P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation." Mol Cell **21**(2): 227-37.
- Yamaguchi, Y., N. Inukai, et al. (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**(9): 2918-27.
- Yamaguchi, Y., T. Takagi, et al. (1999). "NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation." Cell **97**(1): 41-51.
- Yang, X., M. O. Gold, et al. (1997). "TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12331-6.
- Yang, Z., J. H. Yik, et al. (2005). "Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4." Mol Cell **19**(4): 535-45.
- Yang, Z., Q. Zhu, et al. (2001). "The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription." Nature **414**(6861): 317-22.
- Yik, J. H., R. Chen, et al. (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**(4): 971-82.
- Yik, J. H., R. Chen, et al. (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**(12): 5094-105.
- Yik, J. H., R. Chen, et al. (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**(16): 16368-76.
- Zandomeni, R., B. Mittleman, et al. (1982). "Mechanism of action of dichloro-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole: effect on in vitro transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(10): 3167-70.
- Zeng, L. and M. M. Zhou (2002). "Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain." FEBS Lett **513**(1): 124-8.
- Zhong, H., M. J. May, et al. (2002). "The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1." Mol Cell **9**(3): 625-36.
- Zhou, M., M. A. Halanski, et al. (2000). "Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription." Mol Cell Biol **20**(14): 5077-86.
- Zhou, Q. and P. A. Sharp (1996). "Tat-SF1: cofactor for stimulation of transcriptional elongation by HIV-1 Tat." Science **274**(5287): 605-10.
- Zhou, Q. and J. H. Yik (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**(3): 646-59.
- Zhu, J., A. Hayakawa, et al. (2001). "Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro." Biochim Biophys Acta **1521**(1-3): 19-29.
- Zhu, Y., T. Pe'ery, et al. (1997). "Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro." Genes Dev **11**(20): 2622-32.
- Zieve, G. and S. Penman (1976). "Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization." Cell **8**(1): 19-31.
- Zorio, D. A. and D. L. Bentley (2004). "The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways." Exp Cell Res **296**(1): 91-7.



## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\mu$ -	mikro
A	Amper
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5´-Diphosphat
Act D	Aktinomycin D
AMP	Adenosin-5´-Monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5´-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5´-Triphosphatase
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Centimeter
cpm	Zerfälle pro Minute(engl.: counts per minute)
CTP	Cytosin-5´-Triphosphat
d	desoxy
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DRB	5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol

## Anhang

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleotidtrisphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
engl.:	englisch
et al.	und andere (lat.: et alterae)
Exon	Protein-kodierender Abschnitt innerhalb einer prä-mRNA
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
g	Gramm
GpppG	Guanylyl-(5´-5´)-Guanosin-Triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5´-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Intron	nicht kodierender Abschnitt innerhalb einer prä-mRNA
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
k	kilo
l	Liter
m-	Milli-
M	molar
MCS	Klonierungsstelle eines Vektors (engl.: multiple cloning site)
m <sub>3</sub> G	N <sub>2</sub> ,N <sub>2</sub> ,N <sub>7</sub> -Trimethylguanosin
m <sub>7</sub> G	N <sub>7</sub> -Monomethylguanosin
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger-RNA)
n-	Nano-
p-	Piko-

---

P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
prä-mRNA	Primärtranskript einer mRNA
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Reverse Transkription
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
snRNA	kleine nukleäre RNA (engl.: small nuclear RNA)
snRNP	kleines nukleäres RNP (engl.: small nuclear RNP)
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (engl.: small nucleolar RNA)
snoRNP	kleines nukleoläres RNP (engl.: small nucleolar RNP)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UTR	Untranslatierte Region einer mRNA
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen

Vol	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Aminosäuresequenzen

Aminosäuresequenz von LARP7, *accession number*: EU667388

MIPNIEGMETESGNQEKVMEEEESTEKKKEVEKKKRSRVKQVLAD  
IAKQVDFWFGDANLHKDRFLREQIEKSRDGYVDISLLVSFNKMKKLTDDGKLIARALR  
SSAVVELDLEGTRIRRKPLGERPKDEDERTVYVELLPKNVNHSWIERVFGKCGNVVY  
ISIPHYKSTGDPKGFVFEFETKEQAAKAI EFLNNPPEEAPRKPGIFPKTVKNKPIPA  
LRVVEEKKKKKKKGRMKKEDNIQAKEENMDTSNTSISKMKRSRPTSEGSDIESTEPQ  
KQCSKKKKKRDRVEASSLPEVRTGKRKRSSSEDAESLAPRSKVKKIIQKDI I KEASEA  
SKENRDI EISTEEKDTGDLKDSLLKTKRKHKKKHKERHKMGEEVIPLRVL SKSEWM  
DLKKEYLALQKASMASLKKTISQIKSESEMETDSGVPQNTGMKNEKTANREECRTQEK  
VNATGPQFVSGVIVKII STEPLPGRKQVRDTLAAI SEVLYVDLLEGDTECHARFKTPE  
DAQAVINAYTEINKKHCWKLEILSGDHEQRYWQKILVDRQAKLNQPREKKRGTEKLIT  
KAEKIRLAKTQQASKHIRFSEYD

## 8.3 Buchstabensymbole der Aminosäuren und Nukleotide

### Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin

---

F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

**Nukleotidbasen:**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil



## Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Utz Fischer für die Überlassung des Themas, immer offen stehende Türen und die seine Motivation auch in schwierigen Phasen der Arbeit.

Herrn Prof. Buchner sowie Herrn Prof. Höhn danke ich herzlich für die Übernahme des zweiten und dritten Gutachtens.

Vielen Dank Michael, für die vielen fachlichen und privaten Gespräche, für deine Unterstützung und nicht zuletzt dafür, dass du mich in so manchen stressigen Situationen geduldig ertragen hast. (Das Rezept für 10x Probenpuffer findest du übrigens in der Arbeit)

Danken will ich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich über die gesamte Zeit begleitet und unterstützt haben:

Basti, dir sei „Danke“ gesagt für viele gemeinsame Bierchen, für das jeweils neueste ROM, fröhliches Handysuchen in Berlin und nicht zu vergessen den miesesten Kaffee den ich jemals genießen durfte; außerdem gibt's bei dir im Labor den allerbesten Fisch!!

Maritta, bei dir bedanke ich mich für die Zeit mit dir im Labor, dein Lachen und deine ausgeglichene Art. Bleib so wie du bist! (Das war doch nett oder?)

Ashwin und Elham, euch danke ich für ein offenes Ohr bei Problemen und Fragen und wünsche euch alles Gute in eurer neuen, gemeinsamen Wohnung.

Sabine & Katrin... euch beiden danke ich einfach für eure unbeschreibliche Art.

Farah, Lissy, Erika, Gudrun, Emilia, HDS und Jährchen danke ich für die vielen großen und kleinen Dinge die den Laboralltag wesentlich erleichtert haben.

Danke auch an Nils, Holger und Marieke; und immer daran denken: Durchhalten!!

Und für euch Anja, Schorsch und Clemens heißt die Devise: jeder Anfang hat auch irgendwann ein Ende. Viel Erfolg!

Mein Dank gilt ebenso meinen nie müden F-Praktikanten Johannes, Angela M., Jackie und Julia.

Vielen Dank an meine Ex-Laborkollegen Simon, Lusy, Christian, Matthias, Howie und Dr. G. für gemeinsame Kaffeerunden, Badminton und diverse Feiern.

Danke, Bernhard, dass ich im Labor, wie auch privat immer auf deine Unterstützung zählen durfte und darf. Ich muss weg....

Anneli, herzlichen Dank für die zahlreichen Gespräche und deine stete Hilfe, sei es bei Formularen oder anstehenden Terminen. Ich wünsche dir wenig Stress und viel Gesundheit.

Tiefe Dankbarkeit gebührt meiner Mutter. Ohne dich und deine Hilfe wäre all dies nie möglich gewesen. Danke, dass du immer für mich da bist.

Mein größter Dank gilt dir, Eva. Du bist der wichtigste Mensch in meinem Leben und stehst mir bei Allem zu Seite. Ich liebe dich.

DANKE

---

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

Name                    Andreas Markert  
Adresse                Hauptstrasse 5, 85579 Neubiberg  
Geburtsdatum        04/07/1978  
Geburtsort            Bad Königshofen  
Familienstand        ledig

### *Schulischer und akademischer Werdegang*

10/2004 –            Dissertation an der Bayerischen Julius-Maximilians  
aktuell                Universität Würzburg  
  
Doktorarbeit bei Prof. Dr. U. Fischer am Lehrstuhl für  
Biochemie des Theodor Boveri Instituts für  
Biowissenschaften  
  
„LARP7, ein La ähnliches Protein reguliert die  
Elongation der RNA PolymeraseII Transkription durch  
das 7SK RNP“

10/1999 –            Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-  
08/2004                Maximilians Universität Würzburg  
  
Fächer:    Biochemie, Genetik und Molekulare  
                 Pflanzenphysiologie und Biophysik  
  
Diplomarbeit bei Prof. Dr. U. Fischer am Lehrstuhl für  
Biochemie:  
  
„Charakterisierung der putativen DEXH/D-Box RNA  
Helikase Dp103 und ihre Rolle bei der  
Zusammenlagerung von U snRNPs“ mit der Note „sehr  
gut“  
  
Abschluß: Diplom-Biologe mit der Gesamtnote „sehr  
gut“

08/1989 –            Gymnasium Bad Königshofen, Bad Königshofen  
06/1998                Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die die vorliegende Dissertation: „LARP7 – ein La ähnliches Protein reguliert die Elongation der PolII Transkription durch das 7SK RNP“, selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg 2009

Andreas Markert