

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchung des Modifikationsmusters der carboxy-  
terminalen Domäne der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II  
und die Identifikation der CTD-Serin-7-Kinase**



**Martin Heidemann  
München, 2010**

Angefertigt am Helmholtz-Zentrum München,  
Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dirk Eick betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, März 2010

---

Martin Heidemann

Dissertation eingereicht am 11.03.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Becker

Mündliche Prüfung am 22.07.2010

# Synopsis

In Eukaryoten wird die genetische Information von drei Enzymen, den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Pol I-III) in RNA überschrieben. Pol I synthetisiert die ribosomalen RNAs (28S-, 18S- und 5,8S-rRNA), Pol III die Transfer-RNAs (tRNAs) und die 5S-rRNA, doch nur Pol II transkribiert die Protein-kodierenden Gene in Boten-RNAs (mRNAs). Obwohl alle drei eukaryotischen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen sich in Struktur und Zusammenstellung ihrer Untereinheiten stark ähneln, besitzt allein die RNA-Polymerase II eine zusätzliche carboxy-terminale Domäne (CTD) an ihrer größten Untereinheit Rbp1. Es sind viele Funktionen für diese Domäne denkbar, wie z.B. die Interaktion mit Nukleinsäuren oder die Verlagerung von Nukleosomen während der Transkription des Chromatin-Templats. Primär dient die CTD jedoch als eine Bindungs-Plattform für andere Proteine, die an der Transkription, der Prozessierung der mRNA und der Modifikation der Histone beteiligt sind. Die CTD besteht aus vielen Wiederholungen eines Heptapeptids mit der Aminosäuresequenz Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7. In jeder Phase des Transkriptionszyklus herrschen verschiedene Modifikationsmuster dieser Konsensus-Wiederholung vor, von denen jedes vorzugsweise eine bestimmte Auswahl an Faktoren bindet. Diese dynamischen Interaktionen eröffnen Wege um spezifische Schritte der Transkription mit anderen Ereignissen zu koppeln und zu koordinieren. Die Veränderung des CTD-Modifikationsstatus generiert einen lesbaren "Kode" und ermöglicht durch die Rekrutierung der passenden Faktoren zu unterschiedlichen Stufen des Transkriptionszyklus die genaue Regulation der Genexpression. An der dynamischen Modifikation ist eine Fülle von Enzymen beteiligt. Diese beinhaltet Kinasen und Phosphatasen die für die Addition oder Entfernung von Phosphatresten verantwortlich sind. In gleichem Maße sind Glykosyl-Transferasen und Deglykosylasen an der reversiblen Glykosylierung beteiligt. Zusätzlich können Peptidyl-Prolyl-Bindungen, die entweder in *cis*- oder in *trans*-Konformation vorkommen, durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) umgewandelt werden.

In der Literatur ist hauptsächlich die Rolle der Phosphorylierung von Serin-5 und Serin-2 untersucht und charakterisiert worden. Dabei sind Prolin-gerichtete

## Synopsis

---

Serin/Threonin-Kinasen für das charakteristische Muster der Serin-2- und Serin-5-Phosphorylierung verantwortlich, das wiederum mit der Position der Polymerase auf transkribierten proteinkodierenden Genen in Hefe und Säugetieren zusammenhängt. Die Phosphorylierung von Serin-5 durch die Cyclin-abhängige Kinase 7 (CDK7, Kin28 in *S. cerevisiae*), einem Bestandteil des allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIH, tritt nahe des 5'-Endes von Genen am stärksten auf. Serin-5-Phosphorylierung unterstützt *in vivo* die Rekrutierung der Enzyme, die für die Ausbildung der Cap-Struktur verantwortlich sind und eine Methylguanosinkappe an das 5'-Ende der wachsenden mRNA hängen. Die Phosphorylierung von Serin-2 durch CDK9 (Ctk1 in *S. cerevisiae*) hingegen steigt Richtung 3'-Ende der Gene an. Der Serin-2-Phosphorylierung wird eine Hauptrolle in der Überwindung einer frühen Blockade und der Übergang zur Transkriptions-Elongation zugeschrieben. Zudem werden der Spleißvorgang und die Polyadenylierung durch Serin-2/5-phosphorylierte CTD aktiviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier weitere CTD-Modifikationen entdeckt, die den CTD-Kode erweitern. Neben der Glykosylierung von Threonin-4 sowie der Phosphorylierung von Tyrosin-1 und Threonin-4, konnte ich erstmals die Serin-7-Phosphorylierung der CTD während der Transkription nachweisen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Shona Murphy ist es gelungen zu zeigen, dass diese CTD-Modifikation für die Transkription kleiner Kern-RNAs (snRNAs) benötigt wird. Die Entdeckung, dass das Modifikationsmuster der CTD genspezifisch gelesen werden kann, offenbart eine neue Ebene in der Regulation von Genexpression. Daher wurde das CTD-Phosphorylierungsmuster von unterschiedlichen Zellen unter verschiedenen Bedingungen und die Bedeutung der potenziellen CTD-Phosphorylierungsstellen mit Hilfe von CTD-Mutanten untersucht. Hier konnte ich nachweisen, dass sowohl die Sequenz als auch die Anzahl der CTD-Konsensus-Wiederholungen eine wichtige Rolle spielen, ob CTD-Modifikationen stattfinden und sich die dynamische Veränderung des Phosphorylierungsmusters direkt auf Überleben der Zelle auswirkt. Bei Untersuchungen von Organen der Maus konnte ich zeigen, dass sich die CTD-Modifikationsmuster der einzelnen Gewebe voneinander unterscheiden. Zudem konnte ich eine neue Form der RNA-Polymerase II (Pol IIX) identifizieren, die ebenfalls hyperphosphoryliert ist, sich während der Gelelektrophorese im Laufverhalten jedoch deutlich von den bekannten Formen Pol IIO, IIM, IIA und IIB unterscheidet.

## Synopsis

---

Außerdem ist es mir gelungen mit Kin28/CDK7, einer Untereinheit des TFIIH Komplexes, eine Serin-7-Kinase zu identifizieren. Dies ist besonders überraschend, da Kin28/CDK7 an Promotoren proteinkodierender Gene arbeitet und nicht auf nichtkodierende snRNAs beschränkt ist. Zudem ist die Rolle von TFIIH in der Transkription von snRNAs äußerst umstritten. Von Kin28/CDK7 ist außerdem bekannt, dass es die Serin-5-Reste der CTD phosphoryliert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TFIIH-Kinase bivalente Serin-5 und Serin-7-CTD-Markierungen in der frühen Gentranskription setzt.

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht.

Boeing, S., Rigault, C., **Heidemann, M.**, Eick, D., and Meisterernst, M. (2010) RNA polymerase II C-terminal heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is established in a mediator-dependent fashion. *J Biol Chem* 285, 188-196.

Akhtar, M. S.\*, **Heidemann, M.\***, Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Chapman, R. D., Eick, D., and Ansari, A. Z. (2009). TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 34, 387-393.  
(\*= geteilte Erstautorenschaft)

Chapman, R. D., **Heidemann, M.**, Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* 24, 289-296.

Chapman, R. D., **Heidemann, M.**, Albert, T. K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318, 1780-1782.

**Heidemann, M.** (2009). Analysis of RNA Polymerase II Mutants using the xCelligence System. Roche Focus Application Note; Roche Diagnostics GmbH.

Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Rodriguez-Molina, J. B., White, B. E., Akhtar, M. S., Heidemann, M., Li, X., Chapman, R. D., Shokat, K., Keles, S., Eick, D., and Ansari, A. Z. Chemical-genomic dissection of RNA polymerase II CTD marks reveals gene-class specific patterns and Bur1 as an internal Ser7 kinase.  
Eingereicht bei NSMB.

# Inhaltsverzeichnis

**Erklärung**

**Ehrenwörtliche Versicherung**

**Synopsis**

**Publikationen**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen	1
1.2 Die CTD der RNA-Polymerase II	3
1.3 Der Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II	4
1.3.1 Der Beginn des Transkriptionszyklus	5
1.3.2 Die Transkriptions-Elongation	8
1.3.3 Die Termination der Transkription	9
1.4 Die Prozessierung der mRNA	11
1.5 Transkription und Chromatin	13
1.6 CTD-Kinasen	15
1.7 CTD-Phosphatasen	19
1.8 Aufgabenstellung	20
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Materialien	21

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Geräte	22
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.4	Antikörper	24
2.1.5	Peptide	25
2.1.6	Plasmide	25
2.1.7	SiRNA-Sequenzen	27
2.1.8	Puffer und Lösungen	27
2.2.	Methoden	30
2.2.1.	Zellkultur	30
2.2.1.1.	Kultivierung der Zellen	30
2.2.1.2.	Bestimmung der Lebendzellzahl	31
2.2.1.3.	Aufbewahrung der Zellen	31
2.2.2.	Western-Analyse	32
2.2.2.1	Lyse der Säugetier-Zellen	32
2.2.2.2	Lyse der Hefe-Zellen	32
2.2.2.3	Herstellung der Mausgewebe-Proben	33
2.2.2.4	SDS-PAGE und Transfer	33
2.2.3	Immunpräzipitationen	34
2.2.4	<i>In vitro</i> -Untersuchungen der rekombinanten Kinasen	34
2.2.5	SiRNA-Transfektion	35
2.2.6	Chromatin-Immunpräzipitation	36
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Die monoklonalen CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper	38



## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.1	Der CTD-Phosphorylierungsstatus, von der Hefe bis zum Menschen	41
3.1.2	Das CTD-Modifikationsmuster in murinen Geweben	44
3.1.3	Die Kombinationen der CTD-Phosphorylierungen	46
3.2	Veränderungen im Phosphorylierungsmuster der CTD	48
3.2.1	Der Phosphorylierungsstatus der Pol II-CTD in hitzegeschockten Zellen	48
3.2.2	Phosphoserin-2, das schwächste Glied in der Kette?	50
3.3	Die Bedeutung der CTD-Konsensus-Wiederholungseinheiten	52
3.3.1	Der Einfluss der Konsensus-Sequenz auf die CTD-Phosphorylierung	53
3.3.2	Die Bedeutung der CTD-Länge	56
3.4	Die Identifikation der Serin-7-Kinase in Säugetieren	59
3.4.1	Die Charakterisierung potenzieller CTD-Kinasen <i>in vitro</i>	59
3.4.2	Die Auswirkung von Kinase-Hemmung auf die Phosphorylierung der CTD	61
3.5	Die Identifikation der Serin-7-Kinase in <i>S. cerevisiae</i>	64
3.5.1	Die TFIIH-assoziierte Kinase Kin28 phosphoryliert Serin-7 <i>in vitro</i>	64
3.5.2	Kin28 phosphoryliert Serin-5 und Serin-7 <i>in vivo</i>	69
3.6	Die Erweiterung des CTD-Kodes um eine weitere Variable	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1	Die Generierung des CTD-Kodes	75
4.2	Verschiedene CTD-Modifikationen in RNAP II-Populationen	78
4.2.1	Die Isomerisierung der CTD-Proline	80
4.2.2	Die RNA-Polymerase II ist ein Glykoprotein	80
4.3	Die Rolle der neuen CTD-Phosphorylierungen	81
4.4	CDK7/Kin28 ist eine CTD-Serin-7-Kinase	83

## Inhaltsverzeichnis

---

4.5	Die Bedeutung der Heptad-Sequenz	85
4.5.1	Die Bedeutung der CTD-Länge	86
4.5.2	Funktionelle Strukturen innerhalb der CTD-Wiederholungen	88
4.6	Der CTD-Modifikationsstatus reguliert Wechselwirkungen mit dem DNA-Templat	90
4.7	Der CTD-Kode trifft den Histon-Kode	93
4.8	Ausblick	97
<b>5. Literaturverzeichnis</b>		<b>99</b>
<b>6. Appendix</b>		<b>117</b>
<b>7. Danksagung</b>		<b>124</b>
<b>Lebenslauf</b>		

# 1. Einleitung

Es ist für alle zellulären Organismen essenziell die Expression ihrer Gene genau zu regulieren, um sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen und ihr eigenes Wachstum, ihre Entwicklung und Vermehrung, in höheren Organismen sogar den Tod zu kontrollieren. Genexpression beginnt mit der Überschreibung von kodierenden Desoxyribonukleinsäuresequenzen in Ribonukleinsäuretranskripte (Transkription), die wiederum als Vorlage für die Proteinsynthese dienen (Translation).

## 1.1 Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen

Die Transkription ist der erste Schritt die genetische Information zu entschlüsseln. Dieser Vorgang wird von Protein-Komplexen durchgeführt, die aus vielen Untereinheiten aufgebaut sind, den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen. In prokaryotischen Zellen werden tausende verschiedener Gene von einer allgemeinen Maschinerie aus vielen Proteinen überschrieben. Bisher sind die Kristallstrukturen der bakteriellen RNA-Polymerasen von *Thermus aquaticus* und von *Thermus thermophilus* (Vassylyev et al., 2002; Zhang et al., 1999), sowie die der archaeischen RNA-Polymerase von *Sulfolobus solfataricus* bekannt (Hirata et al., 2008). Die allgemeine Struktur besteht aus einem Kernenzym, das aus fünf Untereinheiten aufgebaut ist: Zweimal Alpha, je einmal Beta, Beta', und Omega. Es wurde zudem gezeigt, dass die zusätzliche Untereinheit Sigma essenziell für die Bindungsspezifität der Polymerasen an die Promotor-DNA ist. In Prokaryoten reicht also eine DNA-abhängige RNA-Polymerase aus, um alle Gene in die Vielzahl von RNA-Molekülen zu überschreiben, die die Zelle benötigt.

In den höheren Eukaryoten ist die Transkription der Gene auf drei verwandte Enzyme aufgeteilt, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und jeweils für die Transkription bestimmter Genklassen verantwortlich sind, die RNA-Polymerasen I, II und III. Pol I transkribiert nur die rDNA der ribosomalen Gene und generiert dabei ein vorläufiges Transkript, das in die reifen 5.8S, 18S und 28S rRNAs prozessiert wird. Pol II ist dagegen für die Transkription der tausenden Protein-kodierenden Gene verantwortlich, die die größte Gruppe individueller Gene im eukaryotischen

Genom bilden. Desweiteren transkribiert Pol II auch Gene die für kleine nichtkodierende RNAs wie snRNAs, snoRNAs und miRNAs kodieren. Pol III transkribiert eine Vielzahl kurzer Gene, die für strukturelle oder katalytische RNAs kodieren und kürzer als 400 Basenpaare sind. Dies beinhaltet die Synthese der tRNAs, 5S rRNA, U6 snRNA sowie einiger anderer RNAs mit teilweise unbekannter Funktion. Zudem wurden unlängst in Pflanzen eine vierte und fünfte RNA-Polymerase (Pol IV und V) entdeckt (Herr et al., 2005; Kanno et al., 2005) die siRNAs transkribieren. Diese siRNAs beeinträchtigen die Methylierung der DNA und spielen damit eine Rolle in der Ausbildung von Heterochromatin (Onodera et al., 2005).

**Tabelle 1 Aufbau der RNA-Polymerasen**

Eukaryoten			Archaeen	Bakterien	Kategorie*
Pol I	Pol II	Pol III			
A190	Rpb1	C160	A'+A''	beta'	homolog
A135	Rpb2	C128	B (B'+B'')	beta	homolog
AC40	Rpb3	AC40	D	alpha	homolog
AC19	Rpb11	AC19	L	alpha	homolog
Rpb6	Rpb6	Rpb6	K	omega	homolog/allgemein
Rpb5	Rpb5	Rpb5	H	—	allgemein
Rpb8	Rpb8	Rpb8	—	—	allgemein
Rpb10	Rpb10	Rpb10	N	—	allgemein
Rpb12	Rpb12	Rpb12	P	—	allgemein
A12.2	Rpb9	C11	X	—	
A14**	Rpb4	—	F		
A43**	Rpb7	C25	E		
+ zwei andere		+ vier andere	+ eine andere	—	
589 kDa ( <i>S. cerevisiae</i> )	514 kDa ( <i>S. cerevisiae</i> )	693 kDa ( <i>S. cerevisiae</i> )	380 kDa ( <i>P. furiosus</i> )	375 kDa ( <i>T. aquaticus</i> )	Molekulargewicht (Species)

\*Homolog, Sequenz homolog in allen RNA-Polymerasen; allgemein, in allen eukaryotischen RNA-Polymerasen vorhanden.

\*\* Potenzielle Paraloge der Pol II-Untereinheiten Rpb4 und Rpb7 (Cramer, 2002).

Die drei eukaryotischen Polymerasen setzen sich aus 14 (Pol I), 12 (Pol II) bzw. 17 (Pol III) Untereinheiten zusammen (Tabelle 1). Dabei bilden zehn Untereinheiten einen strukturell-konservierten Kern während die zusätzlichen Untereinheiten in der Peripherie lokalisiert sind. Die zwei größten Untereinheiten sind homolog zu den Beta- und Beta'-Untereinheiten der bakteriellen RNA-Polymerasen. Fünf Untereinheiten sind in allen drei eukaryotischen Polymerasen identisch (Rpb 5, 6, 8, 10 und 12) und zwei weitere werden von Pol I und Pol III geteilt (AC19 und AC40). Die 12 Untereinheiten von Pol II können in drei Kategorien eingeteilt werden (Hahn, 2004). Neben den Untereinheiten, die in allen drei Polymerasen des Zellkerns vorkommen, besitzt Pol II noch Untereinheiten, die homologe Gegenstücke in der bakteriellen Polymerase haben (Rpb1, 2, 3 und 11). Hinzu kommen weitere Untereinheiten (Rpb4, 7 und 9), die zwar spezifisch für Pol II, jedoch nicht essenziell für die Transkriptionselongation sind.

Obwohl der Aufbau aller drei Säugetier-RNA-Polymerasen im enzymatischen Kern fast identisch ist, gibt es große Unterschiede in ihrer Peripherie. Am auffälligsten ist hier die carboxy-terminale Domäne (CTD) von Rpb1, der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II: Diese Domäne besteht aus 378 Aminosäuren und ist in keiner der anderen Polymerasen vorhanden.

### 1.2 Die CTD der RNA-Polymerase II

Rpb1, die große Untereinheit der RNA-Polymerase II, unterscheidet sich in einer Hinsicht enorm von den anderen beiden eukaryotischen RNA-Polymerasen. Sie besitzt nämlich ein einzigartiges Motiv an ihrem Carboxy-Terminus. Diese carboxy-terminale Domäne besteht aus Wiederholungen eines Konsensus-Heptapeptids mit der Sequenz Tyrosin-Serin-Prolin-Threonin-Serin-Prolin-Serin ( $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ ). Die Konsensus-Sequenz ist durch die Organismen hindurch hoch konserviert, unterscheidet sich jedoch in der Anzahl an Wiederholungen in der sie auftritt. Je komplexer ein Organismus ist, desto höher ist die Anzahl der Wiederholungen: Während die Polymerase in *Plasmodium falciparum* nur 17 Wiederholungen besitzt, sind es derer bei *Saccharomyces cerevisiae* schon 26, bei *Drosophila melanogaster* bereits 45 und bei Mäusen und Menschen 52 an der Zahl (Chapman et al., 2008).

Deletionen von mehr als der Hälfte der Wiederholungen in der CTD führen in Hefe, genau wie in der Maus, zu verminderter Zellviabilität. Eine Verkürzung auf fünf

Wiederholungen offenbart einen globalen Defekt in der Transkription eines nativen Templates, weshalb eine solche Mutante nicht lebensfähig ist (Meininghaus et al., 2000). Dennoch kann die Transkription, sowohl *in vitro*, als auch auf transient-transfizierten Templaten ohne die CTD stattfinden, was eher auf eine ergänzende denn eine fundamentale Rolle dieser Struktur hinweist (Corden, 1990; Gerber et al, 1995; McCracken et al, 1997). Das momentane Verständnis der Rolle der CTD kommt hauptsächlich aus Studien der Expression proteinkodierender Gene in entweder der Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, oder in den Gewebekultur-Zellen höherer Eukaryoten. Homozygote Mäuse mit einer Deletion von dreizehn Wiederholungen sind kleiner als ihre Artgenossen in der Wildtypform und haben eine höhere neonatale Sterberate, was andeutet, dass die CTD während der Entwicklung eines Säugetiers wichtig für die Regulation des Wachstums ist (Litingtung et al., 1999).

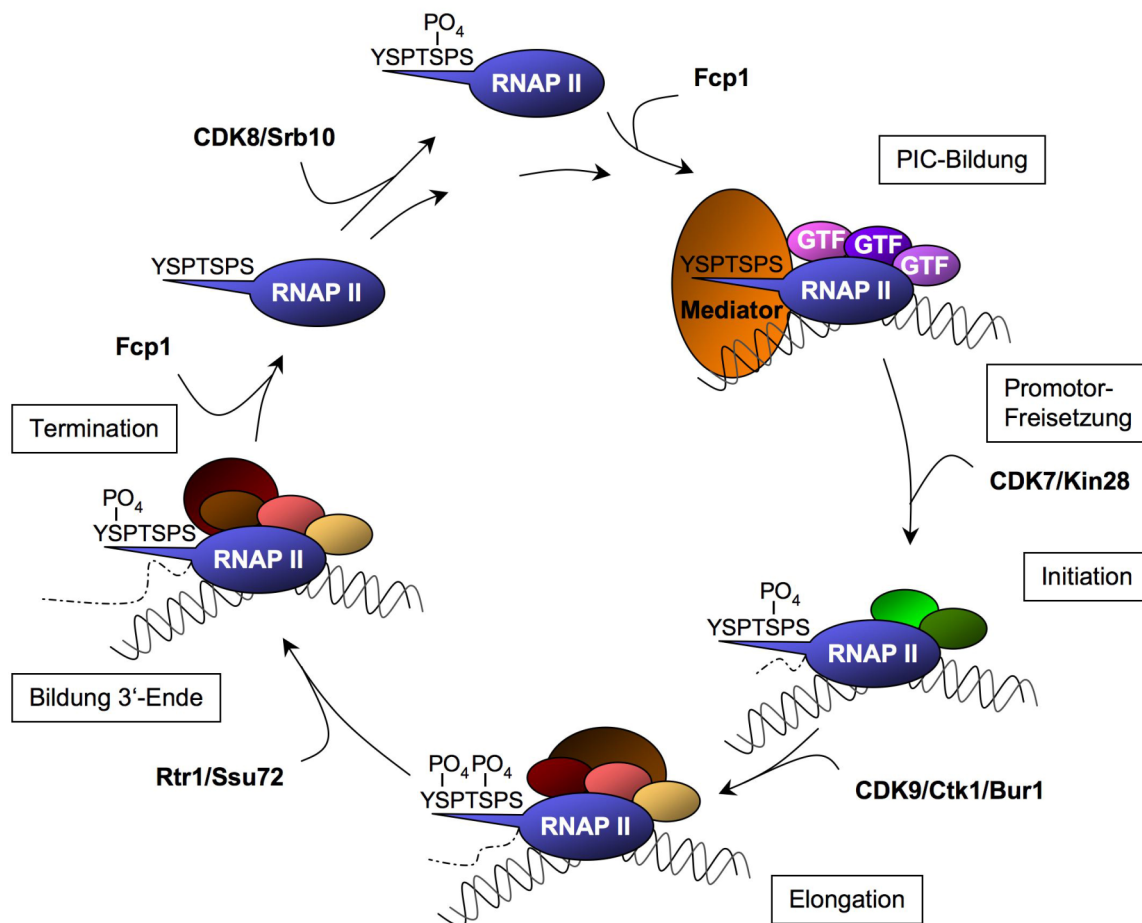
Die CTD dient als Gerüst für die Interaktion einer weiten Anzahl von Kernfaktoren und spielt eine große Rolle in der Transkription und kotranskriptionellen RNA-Prozessierung bei der Expression proteinkodierender Gene, snRNA-Genen in Säugetieren und snoRNA-Genen in der Hefe (Perales und Bentley, 2009). Die CTD erstreckt sich vom Pol II-Kern-Enzym nahe des RNA-Ausgangskanals, wo sie einen idealen Platz innehat um die Reaktionen der RNA-Prozessierung durch direkte oder indirekte Interaktionen mit Bestandteilen der RNA-Prozessierungsmaschinerie zu beeinflussen. Dabei sorgen dynamische und reversible Modifikationen der CTD für eine effiziente und fehlerfreie Ausführung der Transkriptsynthese. In jeder Phase des Transkriptionszyklus herrschen verschiedene Phosphorylierungszustände vor, von denen jeder vorzugsweise eine bestimmte Auswahl an Faktoren bindet. Diese dynamischen Interaktionen eröffnen Wege um spezifische Schritte der Transkription mit anderen Ereignissen zu koppeln und zu koordinieren um eine angemessene Genexpression zu ermöglichen.

### **1.3 Der Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II**

Der Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II kann in sechs aufeinanderfolgende Abschnitte unterteilt werden: 1. Die Ausbildung des Prä-Initiations-Komplexes (PIC), 2. Die Transkriptions-Initiation, 3. Die Freisetzung vom Promotor, 4. Die Elongation, 5. Die Ausbildung des 3'-Endes, und schlussendlich 6. Die Termination der

Transkription. Sobald die Polymerase die Transkription vollendet hat, kann sie recycelt werden und aufs Neue mit der Synthese einer RNA beginnen.

Der Phosphorylierungs-Status der CTD, der durch das Wechselspiel zwischen CTD-Kinasen und Phosphatasen reguliert wird, bestimmt dabei das Fortschreiten durch den Transkriptions-Zyklus (Abb. 1).



**Abb. 1. Der Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II.** Die hypophosphorylierte Pol II bildet zusammen mit den GTFs und dem Mediator den PIC. Kurz darauf wird die CTD an ihren Serin-5-Resten phosphoryliert wodurch die Freisetzung vom Promotor ausgelöst wird. Die Phosphorylierung an Serin-2 durch CDK9/Ctk1 führt zur produktiven Elongation. Die Phosphatasen Rtr1/Ssu72 und Fcp1 dephosphorylieren die CTD und recyceln auf diese Weise die Pol II für eine neue Transkriptionsrunde. CDK8/Srb10 kann die Transkription durch die Phosphorylierung der CTD an Serin-5 hemmen, bevor es zu der Ausbildung des Prä-Initiations-Komplexes kommt.

### 1.3.1 Der Beginn des Transkriptionszyklus

Eine Vielzahl von Faktoren steuert die Initiation der Transkription von Genen. Die hypophosphorylierte Pol II wird zusammen mit den allgemeinen Transkriptions-

faktoren (GTFs) und dem Mediator-Komplex an den Promotor rekrutiert. Veränderungen in der Chromatinstruktur bestimmter Kontrollbereiche beeinflussen zudem den Zugang von Aktivatorproteinen, die die Rekrutierung eines Prä-Initiations-Komplexes an eine Genpromotor-Region anregen. Diese Elemente können viele tausend Basenpaare entfernt liegen und die Transkription eines Genlocus sowohl positiv („Enhancer“) als auch negativ („Silencer“) beeinflussen (Seipel et al., 1992). Bevor die Rekrutierung der Pol II erfolgt, müssen zuerst die GTFs an den Promotor binden. Diese Proteine werden als „allgemein“ bezeichnet, weil sie an allen Promotoren benötigt werden, die von Pol II genutzt werden. Das typische Modell aus dem Lehrbuch zur Entstehung eines PICs beginnt mit der Bindung von TFIID an den Promotor, gefolgt von TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIH und den verbleibenden GTFs, einschließlich der RNA-Polymerase II. Die Promotoren von eukaryotischen Genen der Klasse II enthalten Elemente, die die GTFs zu ihrer Bindungsstelle dirigieren. Die Startstelle der Transkription enthält normalerweise ein Pyrimidin-reiches Initiator-Element (INR) das TFIID bindet. Ungefähr fünfundzwanzig bis dreißig Basenpaare stromaufwärts des INR-Elements liegt die TATA-Box. Dieses Element wird von dem TA-TA-Box-Bindeprotein (TBP), einer Untereinheit von TFIID, erkannt und gebunden, wodurch ein Knick in der Promotor-DNA entsteht. Dadurch kann TFIIB das benachbarte BRE-Element (TFIIB-Recognition-Element) binden, das unmittelbar neben der TATA-Box liegt. Die Bindung von TFIIB stabilisiert die Bindung von TFIID mit der DNA und bildet damit die Plattform für die Rekrutierung des Pol II/TFIIF-Komplexes. Im Gegensatz zu den meisten anderen Transkriptionsfaktoren bindet TFIID auch an eine Sequenz in dem transkribierten Bereich stromabwärts von INR, nämlich an das Downstream-Promoter-Element (DPE).

Der Faktor TFIID setzt sich aus mindestens acht TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammen und spielt eine Rolle bei der spezifischen Erkennung der Promotor-Sequenzen und bei der Transkription, die durch Aktivatoren angeregt wurde (Komarnitsky et al., 1999). Interessanterweise erlaubt ein TAF-enthaltender Komplex (TFTC), der durch den Abgang von TBP von TFIID entsteht, immer noch basale und aktivierte Transkription von Promotoren, unabhängig ob diese eine TATA-Box beinhalten oder nicht. Mehrere TAFs zeigen eine Homologie in Sequenz und Struktur zu Histonen und ihre Möglichkeiten DNA zu binden, könnte, ähnlich dem bakteriellen Sigma-Faktor, helfen spezifische Promotor-Sequenzen zu erkennen.



Die Ausbildung eines Prä-Initiations-Komplexes (PIC) hat zur Folge, dass die DNA in dem Bereich der Startstelle der Transkription in einem ATP-abhängigen Prozess aufgeschmolzen wird. Der TFIIH-Komplex der Säugetiere besteht aus neun Untereinheiten und ist der einzige GTF der ATP-abhängige Enzymaktivitäten besitzt (Dvir et al., 1996). TFIIH enthält die zwei Helikasen XPB und XPD (*Xeroderma pigmentosum*), sowie eine Cyclin-abhängige Kinase (Kin28/Ccl1 in *S. cerevisiae*; CDK7/Cyclin H in *H. sapiens*). Der aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte Mediator-Komplex ist essenziell für die basale und aktivierte Transkription und übermittelt Signale von regulatorischen Faktoren an die Pol II (Hahn, 2004; Lee und Young, 2000). Der Aufbau des PIC kann durch eine frühe Phosphorylierung an den Serin-5-Resten der CTD durch die Kinaseaktivität einer Untereinheit des Mediators, Srb10/Srb11 (Suppressor der RNA-Polymerase B) der Hefe bzw. CDK8/Cyclin C in Säugetieren, verhindert werden (Hengartner et al., 1998). Nach der Bildung des PIC jedoch führt die Phosphorylierung von Serin-5 durch die Kinase-Untereinheit des TFIIH-Komplexes zu einem Übergang vom PIC über die Ablösung vom Promotor hin zur Initiation der Transkription (Hengartner et al. 1998). Der Mediator-Komplex schlägt also eine Brücke zwischen Aktivatoren und der Pol II. Er bindet zwar an unphosphorylierte Polymerase, aber sobald er in den PIC eingegliedert wird, stimuliert er die CTD-Kinase des basalen Transkriptions-Faktor TFIIH. Diese Phosphorylierung unterbricht die Bindung zum Mediator (Max et al., 2007). Die Serin-5-Phosphorylierung durch Kin28/CDK7 wird wiederum durch Srb10/CDK8 kontrolliert, da diese Kinase das Cyclin von Kin28/CDK7 phosphorylieren, und darüber regulieren kann (Akoulitchev et al., 2000). Demzufolge bewirkt der Mediator seine eigene Freigabe von der CTD nachdem er seine Mission, die Polymerase am Promotor abzuliefern, erfolgreich beendet hat. Nach der Serin-5-Phosphorylierung der CTD durch Kin28/CDK7 und der Ablösung vom Promotor verbleiben die allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der Mediator teilweise als Gerüst, wodurch es neuen Polymerasen ermöglicht wird am Promotor zu re-initiieren und das Gen zu transkribieren (Hahn, 2004). Während der frühen Elongations-Phase kurz nach der Initiation, solange sich noch kein stabiler Elongations-Komplex ausgebildet hat, neigt die Polymerase dazu, sich von der RNA zu lösen, wodurch kurze RNA-Produkte auftreten (Pal und Luse, 2003). Diese abortive Initiation verringert sich deutlich, sobald die synthetisierte RNA eine bestimmte Länge erreicht hat, wodurch die Stabilität des Transkriptions-Komplexes deutlich zunimmt (Kireeva et al., 2000). Kurz

nach der Initiation bindet der hetero-dimere Faktor Spt4/5 (auch bekannt als DSIF für DRB-Sensitivität-induzierender Faktor) an die Pol II (Wada et al., 1998) und rekrutiert in der Folge den negativen Elongations-Faktor NELF, der die Transkriptions-Maschinerie in Promotor-nahen Bereichen festsetzt (Yamaguchi et al., 1999). Während dieses Zeitfensters werden die Capping-Enzyme Phosphoserin-5 - abhängig rekrutiert (Pei und Shuman, 2002).

### 1.3.2 Die Transkriptions-Elongation

Während des Übergangs von der Initiation hin zur produktiven Elongation werden die Serin-2-Reste der CTD, sowie die Spt5-Untereinheit des negativen Transkriptions-Elongations-Faktors DSIF durch die Kinase-Untereinheit CDK9/Cyclin T des positiven Transkriptions-Elongations-Faktor B (P-TEFb) phosphoryliert (Yamada et al., 2006). Dadurch wird die Hemmung der Polymerase durch die Interaktion mit Spt4/5 und NELF beendet und die Transkriptions-Maschinerie in die Phase der produktiven Transkript-Elongation entlassen (Peterlin und Price, 2006). In der Hefe hat CDK9 zwei potenzielle Homologe, Ctk1 und Bur1. Bei beiden handelt es sich um Kinasen, die für eine effiziente Transkriptions-Elongation essenziell sind.

Auf den ersten Blick scheint die Phase der Transkriptions-Elongation eine simple Aneinanderreihung von Nukleotiden ans 3'-Ende der RNA-Kette zu sein. Aber auch diese produktive Phase unterliegt einem hohen Grad der Regulation. Dies ist notwendig, da die Pol II auf ihrem Weg über das Gen verschiedene Hürden überwinden muss. Eine Art dieser Hindernisse kommt, neben induziertem oder Sequenz-abhängigem Pausieren und Arrest, direkt vom DNA-Templat selbst. So können DNA-Läsionen, die z.B. durch Bestrahlung mit UV-Licht entstanden sind, die Polymerase abhalten, mit der Addition von Nukleotiden fortzuschreiten. Die Pol II verweilt an diesen Läsionen bis sich die Bestandteile der TCR (Transkriptions-gekoppelte Reparatur)-Maschinerie zusammengesetzt und das betroffene DNA-Fragment entfernt haben. Die Polymerase erreicht auch Stellen, die innerhalb des Templats liegen und oft reich an Adenin und Thymin sind, an denen sie pausiert. An diesen Stellen bewegt sich die Pol II rückwärts, wodurch das 3'-Ende der RNA durch die Pore unter dem aktiven Zentrum gedrückt wird (Cramer et al., 2000). Der Elongations-Faktor TFIIIS unterstützt die Polymerase durch die Spaltung der herausgedrückten RNA dabei, dieses Hindernis zu überwinden (Fish und Kane,

2002). Dabei verstärkt TFIIIS eine schwache Nuklease-Aktivität der Pol II selbst. Die Spaltung wird vollzogen, indem TFIIIS in die Pore eingeführt wird und dort das aktive Zentrum der Polymerase modifiziert, wodurch die Nuklease-Aktivität ausgelöst wird (Kettenberger et al., 2003). Außerdem transkribiert die Pol II in der Zelle keine nackte DNA sondern ein Chromatin-Templat. Der Grundbaustein von Chromatin ist das Nukleosom, das aus einem Oktamer von vier Histon-Proteinen besteht, die in 147 Basenpaare DNA eingewickelt sind. Die Nukleosomen bilden anfangs einen Transkriptions-Block und die Struktur des Chromatins muss durch bestimmte Faktoren verändert werden, damit die Transkriptions-Maschinerie ihre Aufgabe erledigen kann. Bei der Rekrutierung dieser Faktoren spielt wiederum das Modifikationsmuster der CTD eine tragende Rolle.

Sobald die elongierende Pol II die 3'-Bereiche der Gene erreicht und die Polyadenylierungsstelle transkribiert, tritt der Transkriptions-Zyklus in die letzte Phase ein, die Spaltung/Polyadenylierung und Termination.

### **1.3.3 Die Termination der Transkription**

Der Terminations-Mechanismus der RNA-Polymerase II ist, im Vergleich zu den beiden anderen eukaryotischen RNA-Polymerasen, bisher am wenigsten verstanden. Eine besondere Eigenschaft der Termination von Protein-kodierenden Genen, die von Pol II in mRNA überschrieben werden ist, dass das Enzym die Transkription nicht an einer bestimmten Position am Ende des Gens abbricht wie das bei Pol I oder Pol III der Fall ist. Der Ort der Termination scheint zufällig gewählt zu werden, manchmal bis zu 1000 Basenpaare stromabwärts der Poly-(A)-Stelle, wo das entstehende Transkript durch spezielle Faktoren geschnitten und von der Transkriptions-Maschinerie getrennt wird. Dennoch steht fest, dass die Termination abhängig von der Anwesenheit eines funktionalen Poly-(A)-Signals stattfindet und an die RNA-Prozessierungsschritte gekoppelt ist (Buratowski, 2005; Proudfoot, 1989). Außerdem ist klar, dass die Pol II andere Mechanismen für die Termination der mRNA-Transkription nutzt, als für die Termination der Gene, die für snRNAs (kleine Kern-RNAs), snoRNAs (kleine nukleoläre RNAs) und CUTs (kryptische instabile Transkripte) kodieren, die jeweils nicht polyadenyliert werden. Überraschenderweise werden in der Hefe zwar Rat1 und Polyadenylierungs-Faktoren an diesen Genen lokalisiert, aber Mutationen, die die Rat1-Aktivität oder die Spaltung an der Poly-(A)-

Stelle verhindern, beeinträchtigen die Termination nicht. Diese wird durch den Nrd1-Nab3-Sen1-Komplex (Vasiljeva et al., 2008) und Ssu72 (Kim et al., 2006; Lykke-Andersen und Jensen, 2007) vermittelt. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Modelle, die versuchen die Termination der Transkription Protein-kodierender Gene zu erklären, das „Torpedo-Modell“ und das „allosterische Modell“.

Das „Torpedo-Modell“ besagt, dass nach Induktion durch eine Poly-(A)-Stelle das naszierende Transkript gespalten wird und die stromabwärts befindliche RNA durch eine 5'-3'-Exonuklease abgebaut wird. Dieses Enzym gibt das Signal zur Termination der Transkription sobald es die noch elongierende Polymerase erreicht. Das „Torpedo-Modell“ wurde durch die Entdeckung einer möglichen Nuklease namens Rtt103 unterstützt, die über ihre CTD-Interaktions-Domäne (CID) mit der Pol II wechselwirken könnte. Zusätzlich wurde herausgefunden, dass der Rat1/Rai1-Nuklease-Komplex mit Pol II/Rtt103 an der Polyadenylierungsstelle interagiert (Kim et al., 2004). Bei Rat1 handelt es sich um eine lebenswichtige 5'-Exoribonuklease, die sich im Zellkern befindet und dort am Umsatz der RNA beteiligt ist. Diese 5'-3'-Exoribonuklease bevorzugt als Substrat RNAs mit einem 5'-Monophosphat und zeigt nur schwache Aktivität gegenüber RNAs mit einer 5'-Hydroxyl-Gruppe sowie einzelsträngiger DNA (ssDNA). RNAs mit einer 5'-Kappe oder Triphosphat werden hingegen nicht abgebaut (Poole und Stevens, 1995; Stevens und Poole, 1995). Gemeinsam mit Rat1 wurde ein weiteres Protein aufgereinigt, das später als Rai1 identifiziert wurde und die Exonuklease-Aktivität von Rat1 stabilisiert (Xue et al., 2000). Zellen, die zwar eine intakte Spaltungs- und Polyadenylierungs-Maschinerie besitzen, in denen aber Rat1 mutiert und funktionsuntüchtig gemacht wurde (Amberg et al., 1992) bzw. in denen der Kofaktor Rai1 deletiert ist, zeigen dramatische Defekte in der Termination der Transkription (Kim et al., 2004). Die Transkripte werden in diesen Zellen nach der induzierten Spaltung größtenteils stabilisiert. Ähnliche Ergebnisse wurden in unabhängigen Studien am menschlichen  $\beta$ -Globin-Gen erzielt. Bei diesem Gen ist die Polyadenylierungsstelle mit einer autokatalytischen RNA-Struktur assoziiert, die sich selbst spaltet, sobald sie transkribiert wurde (= kotranskriptionelle Spaltung, CoTC) (Teixeira et al., 2004). Diese Spaltung generiert an der RNA ein freies 5'-Ende, welches durch XRN2, dem menschlichen Homolog zu Rat1, abgebaut wird und so die Termination induziert (West et al., 2004). Zudem wird die Rat1/Rai1-Aktivität auch für eine effiziente

Termination der Transkription durch RNA-Polymerase I benötigt (El Hage et al., 2008).

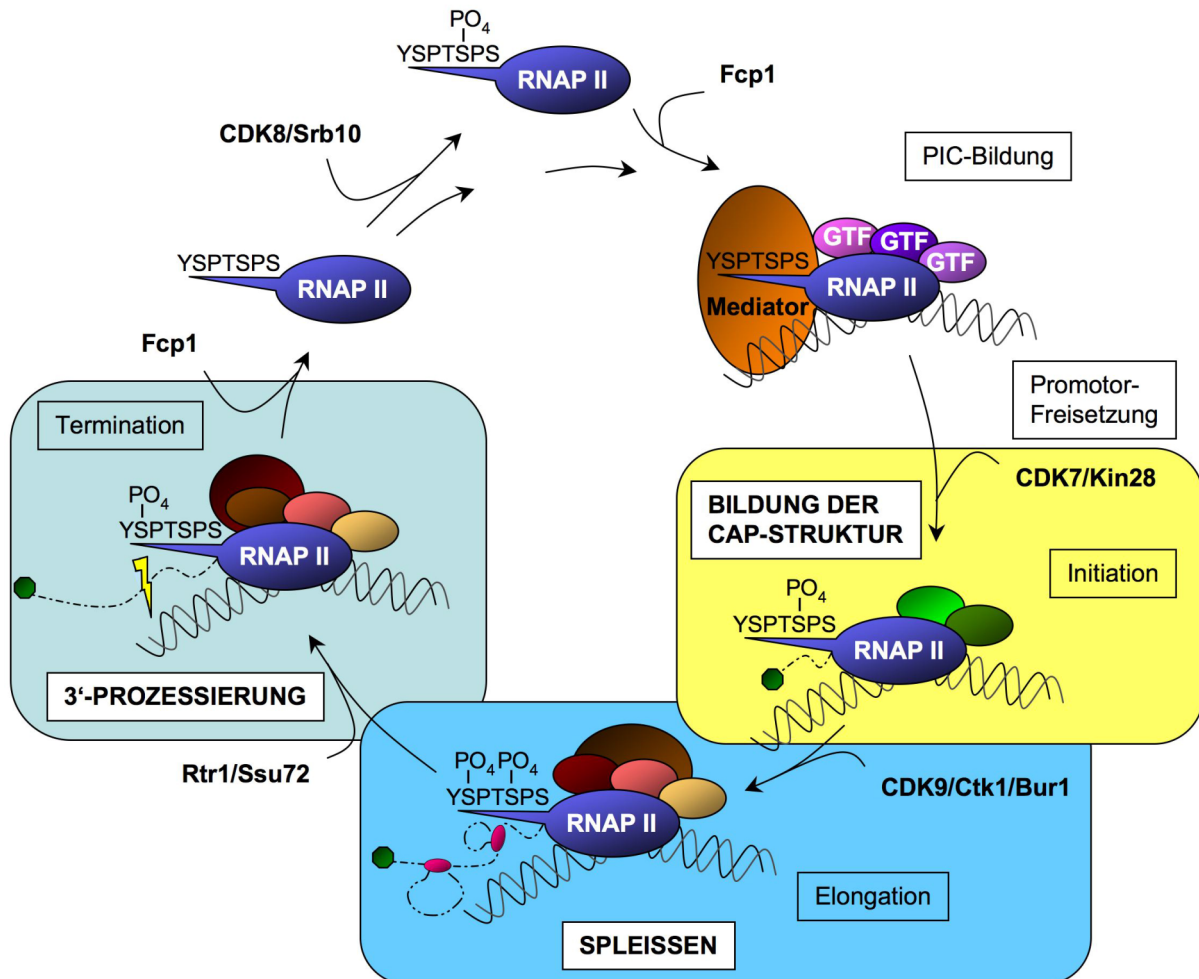
Das "Torpedo-Modell" ist nicht die einzige Erklärung für die Ereignisse an den 3'-Enden der Gene. Zuerst wurde der Prozess der Termination mit dem „allosterischen Modell“ erklärt. In diesem Modell löst die Transkription der Poly-(A)-Sequenz eine Veränderung der Pol II-assoziierten Faktoren aus (Logan et al., 1987). Dies könnte die Bindung von Terminations-Faktoren und/oder die Ablösung eines Anti-Terminations-Faktors, z.B. durch die Spaltungs- und Polyadenylierungs-Faktoren, beinhalten. Tatsächlich existieren Daten, die dieses Modell stärker stützen als das „Torpedo-Modell“. Zum einen scheint die Spaltung des Transkripts, die von der Poly-(A)-Stelle induziert wird und für die Erklärung durch das „Torpedo-Modell“ unabdingbar ist, keine Voraussetzung für die Termination an sich zu sein: So beeinträchtigen Mutanten von Pcf11 und Ssu72, und die damit verbundene Störung der Poly-(A)-induzierten Spaltung, die Termination kaum (Dichtl et al., 2002; He et al., 2003; Sadowski et al., 2003). Elektronenmikroskopische Studien in *Xenopus* und *Drosophila* zeigten zudem, dass die Termination stattfindet, bevor das Transkript gespalten wird bzw. sogar gänzlich ohne eine Spaltung stattfinden kann (Osheim et al., 1999; Osheim et al., 2002). Eine andere Studie zeigte wiederum, dass Rat1 und XRN2 zwar für einen kotranskriptionellen Abbau der RNA verantwortlich sind, es sich hier aber nicht um die Faktoren handelt, die die Termination auslösen (Luo et al., 2006). Vielmehr wurde gezeigt, dass Rat1 an der Rekrutierung von 3'-Prozessierungs-Faktoren mitwirkt und dadurch indirekt an der Termination beteiligt ist.

Sobald die Transkription terminiert wird, löst sich die Pol II vom DNA-Templat und muss recycelt werden, um an einer neuen Runde des Transkriptions-Zyklus teilzunehmen. Das Recycling setzt nicht nur die Entfernung der Elongations-spezifischen Kofaktoren voraus, sondern ebenso die Dephosphorylierung der CTD durch spezifische Phosphatasen.

### **1.4 Die Prozessierung der mRNA**

Der Phosphorylierungs-Status der CTD bestimmt nicht nur den Fortschritt innerhalb des Transkriptions-Zyklus, sondern beeinflusst auch die Rekrutierung der mRNA-Prozessierungs-Maschinerie, die für die Bildung der Cap-Struktur, den Spleißvorgang

und die Polyadenylierung der Prä-mRNA zuständig ist. Obwohl diese Ereignisse nacheinander erfolgen, sind sie eng miteinander verbunden und werden durch die CTD koordiniert, die dabei als Andockstelle für die verantwortlichen Enzyme dient (Abb. 2).



**Abb. 2. Regulation der kotranskriptionellen Prozessierung der mRNA durch den Phosphorylierungsstatus der CTD.** Die Phosphorylierung von Serin-5 durch CDK7/Kin28 resultiert in der Rekrutierung der Maschinerie zur Ausbildung der Cap-Struktur. Die Serin-5- und Serin-2-phosphorylierte Pol II rekrutiert während der Elongation die Proteine, die am Spleißvorgang beteiligt sind. Serin-2-Phosphorylierung am 3'-Ende der Gene ist Voraussetzung zur Rekrutierung der 3'-Prozessierungsmaschinerie, wodurch die Reifung des naszierenden Transkripts abgeschlossen wird.

Nach der Synthese von etwa 20 bis 30 Nukleotiden wird das 5'-Ende der Prä-mRNA mit einem 7-Methylguanosin verknüpft und durch den Cap-Bindungskomplex gebunden. Das effiziente „Capping“ erfordert ein Pausieren der Polymerase nahe des Promotors, und die Rekrutierung der Enzyme wird durch die Phosphorylierung

der CTD an ihren Serin-5-Resten angeregt (Coppola et al. 1983). Die Serin-5-phosphorylierte CTD bietet wiederum eine Andockstelle für den Capping-Apparat (Komarnitsky et al. 2000; Pei et al. 2001). Sobald die Bildung der Cap-Struktur abgeschlossen ist, wird die Polymerase reaktiviert, wodurch sichergestellt wird, dass nur Transkripte mit Cap weiter elongiert werden (Pei et al., 2003).

Die Elemente des Spleißosoms binden direkt an die hyperphosphorylierte CTD und Introns werden kotranskriptionell entfernt (Du und Warren 1997; Kim et al., 1997; Hirose et al., 1999). Nachdem die Polymerase die Polyadenylierungsstelle passiert hat, bindet die 3'-Prozessierungs-Maschinerie an die Serin-2-phosphorylierte CTD und spaltet/polyadenyliert die mRNA (Hirose and Manley 1998; Barilla et al. 2001; Ahn et al. 2004). Die wechselseitigen Abhängigkeiten und Verflechtungen all dieser kotranskriptionellen Prozesse wird in mehreren Aspekten offenkundig. Der Cap-Bindungs-Komplex verstärkt nicht nur das Spleißen, indem er mit Spleiß-Faktoren interagiert und die Erkennung der Cap-nahen 5'-Spleißstelle fördert (Colot et al., 1996; Lewis et al., 1996), sondern stimuliert auch die Spaltung der Prä-mRNA (Flaherty et al., 1997). Die Verflechtung zwischen Spleißen und Polyadenylierung wurde auch anhand des IgM-Gens gezeigt, wo eine Auswahl der Polyadenylierungsstelle vom Spleißen abhängt, und darüber entscheidet, ob das Protein löslich ist oder in der Membran verankert wird (Takagaki et al., 1996; Takagaki und Manley 1998).

### **1.5 Transkription und Chromatin**

*In vivo* läuft die Transkription der genetischen Information immer im Zusammenhang mit Chromatin ab. Dabei liefert die Dichte des Chromatins die erste Ebene der Regulation. Die Transkription wird auf dieser Ebene durch die physikalische Zugänglichkeit der Promotor- und Enhancer-Bereiche für die Transkriptionsmaschinerie, einschließlich der Polymerase und allgemeiner Transkriptionsfaktoren, gesteuert. Sobald die Polymerase die Transkription begonnen hat, muss sie die Barrieren in Form von Histonen auf dem DNA-Templat überwinden. Mehrere zusätzliche Faktoren sind notwendig um der Polymerase zu helfen, sich ihren Weg durch die, um Nukleosomen gewickelte, DNA zu bahnen. Dabei sind die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen der Histone mit bestimmten Stadien der Transkription verknüpft. Dieser sogenannte Histon-Kode

umfasst, ähnlich dem Modifikationsmuster der CTD, eine Bandbreite an reversiblen Modifikationen, die an die Histon-Schwänze angebracht werden. Darin eingeschlossen sind Acetylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen, die die Interaktionsoberflächen in Antwort auf zelluläre Signale verändern und somit für Bindungspartner zugänglich machen können. So wurde die Trimethylierung des Lysins an Position 9 von Histon H3, das eine Bindungs-Plattform für das Heterochromatin-Protein HP-1 darstellt, an transkriptionell-inaktivem Heterochromatin gefunden. Die Trimethylierung von H3-K4 findet sich hauptsächlich an einem bestimmten Bereich nahe der Transkriptions-Startstelle aktiver Pol II-Gene. Zusätzlich finden sich an transkriptionell-aktiven Genen auch Methylierungen an H3-K36 sowie H3-K79 (Guenther et al., 2007; Peters und Schubeler, 2005). Die Histon-Acetylierung, die mit einer Auflockerung und besserer Zugänglichkeit des Chromatins in Verbindung gebracht wird, tritt hauptsächlich an Histon H4 auf (Sterner und Berger, 2000).

Interessanterweise ist der Status des Chromatins des transkribierten DNA-Templats eng an den Phosphorylierungsstatus der CTD gebunden (Berger, 2007; Hampsey und Reinberg, 2003). So werden in der Hefe die Histon-Methyltransferasen Set1 und Set2 während der Transkription durch Ser5- bzw. Ser2-/Ser5-Phosphorylierung der CTD rekrutiert. Außerdem findet die Methylierung von Lysin-4 von Histon H3 durch Set1 hauptsächlich am 5'-Ende der Gene statt, während die Methylierung des Lysins an Position 36 von Histon H3 durch Set2 in Richtung des 3'-Endes der Gene zunimmt. Set1 interagiert mit der CTD über den Paf1-Komplex (Hampsey und Reinberg, 2003), während Set2 direkt die CTD-Wiederholungen erkennt, die die Ser2/Ser5-Doppelphosphorylierung tragen (Kizer et al., 2005). Demnach schaffen die Histon-Methylierungszustände eine deutliche Verbindung zwischen dem CTD- und dem Histon-Kode. Zudem interagiert die Histon-Acetyltransferase p300 mit der unphosphorylierten CTD der RNA-Polymerase II, was wiederum ihre Rekrutierung in die Nähe der Initiationsstellen begünstigen könnte. Im Gegensatz dazu, interagiert die Histon-Acetyltransferase PCAF mit der hyperphosphorylierten Pol II<sub>0</sub>-Form, wodurch möglicherweise die Elongation durch Chromatin erleichtert wird (Cho et al., 1998).



## 1.6 CTD-Kinasen

Dynamische und reversible Modifikationen der CTD sorgen für eine effiziente und fehlerfreie Ausführung der mRNA-Synthese. Dabei ist die Rekrutierung von Transkriptions- und Prozessierungsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten während des Transkriptionszyklus eng mit dem Phosphorylierungsstatus der CTD verbunden. Die Enzyme, die für diese Modifikationen verantwortlich sind, wurden vorerst *in vitro* identifiziert, bevor sie später in *in vivo*-Experimenten untersucht werden konnten. Die größte Gruppe der potenziellen CTD-Kinasen stellen die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) dar, welche einen zusätzlichen Kofaktor, das Cyclin, benötigen um ihre volle Aktivität entfalten zu können. Da die Konzentration der jeweiligen Cycline eng an den Zellzyklus gekoppelt ist, können die CDKs in ihrer Aktivität und Substratspezifität reguliert werden, je nachdem ob bzw. mit welchem Cyclin sie assoziieren. Eine weitere Ebene der Regulation besteht darin, dass diese Kinasen selbst bzw. Faktoren mit denen sie einen Komplex bilden, phosphoryliert werden können. Da bei *in vitro*-Experimenten jedoch Bedingungen gelten, die es so in einer Zelle unter Umständen niemals geben würde, führte dies oft zu unterschiedlichen, teilweise sogar widersprüchlichen, Ergebnissen im Hinblick auf die Spezifität und Funktion der Kinasen. So phosphorylierten z.B. die Säugetier-Kinasen CDK7/Cyclin H, CDK8/Cyclin C und CDK9/Cyclin T1/T2/K allesamt *in vitro* vorzugsweise CTD-Serin-5, was aber nicht ausschließt, dass diese Kinasen *in vivo* Serin-2 phosphorylieren, sobald sie mit anderen Faktoren assoziiert sind (Oelgeschlager, 2002). Um dieser Problematik zu begegnen wurden *in vivo*-Studien in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* durchgeführt. In diesem Modellorganismus war es möglich mithilfe von genetischen und biochemischen Herangehensweisen vier CDKs zu identifizieren, die an der Transkription beteiligt sind: Das CDK7-Homolog Kin28, Srb10 (CDK8), sowie Ctk1 und Bur1, die mit der CDK9 der Säugetiere verwandt sind. Es ist bekannt, dass alle vier dieser Kinasen die CTD von Pol II phosphorylieren, jedoch eine unterschiedliche Rolle bei der Expression von Genen spielen (Prelich, 2002).

Bei Kin28 handelt es sich um ein essenzielles Gen und einer Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIIF. Die Rolle der Kin28/CDK7-Kinase-Aktivität während der Transkription war lange umstritten. Northern-Blots und die Analyse der genomweiten Expression zeigten, dass Kin28 Voraussetzung für normale Level von Pol II-Transkripten ist (Holstege et al., 1998). Außerdem wird die Kin28-Aktivität für

die Bindung der Capping-Enzyme an die phosphorylierte CTD benötigt. Studien über den Einfluss von Kin28, die mithilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt wurden, führten zu gegensätzlichen Ergebnissen bezüglich der Wichtigkeit dieser Kinase (Komarnitsky et al., 2000; Schroeder et al., 2000). So existieren Studien, die mit Hilfe des Kinase-Inhibitor H8 oder einer mutierten Kin28 bzw. CDK7 zeigen, dass die Transkription stark von dieser Kinase-Aktivität abhängt (Akoulitchev et al., 1995; Jiang et al., 1996). Wiederum andere Daten zeigen, dass diese Kinase-Aktivität für die Expression Pol II-transkribierter Gene gänzlich entbehrt werden kann (Makela et al., 1995; Kanin et al., 2007). In Säugetieren erfüllt die Kinase CDK7, je nachdem mit welchem Komplex sie assoziiert ist, zwei Funktionen. Sie bildet mit dem Cyclin H und MAT 1 (*ménage à trois*) den trimeren CAK-Komplex (CDK-aktivierende Kinase) und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Der CAK-Komplex wird für den Aufbau des CDK1/Cyclin B-Komplexes, sowie für die Anregung der CDK2-Aktivität benötigt (Larochelle et al., 2007). Der CAK-Komplex bildet wiederum zusammen mit dem TFIIH-Kern-Komplex den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIH und phosphoryliert die Serin-5-Reste der Pol II-CTD.

Die zweite der identifizierten CTD-Kinasen, Srb10 samt ihrem Cyclin Srb11, ist eine nicht-essenzielle Untereinheit des Mediator-Komplexes, und wurde ursprünglich als ein Suppressor von CTD-Verkürzungen identifiziert. Der Mediator bindet die Pol II und wird *in vitro* wie *in vivo* für die Transkription in der Hefe benötigt (Lee et al., 2000). Es wurde herausgefunden, dass Srb10 sowohl positiv, als auch negativ auf die Genexpression wirken kann. So führte die Deletion von Srb10 genomweit zur Aufhebung der Hemmung von 173 Genen in Glukose-reichem Medium (Holstege et al., 1998). In der Folge wurde die inhibierende Funktion von Srb10 bestätigt, da die Kinase *in vitro* die Pol II vor der Ausbildung des PICs phosphoryliert und dadurch hemmt (Hengartner et al., 1998). Zudem wurde entdeckt, dass auch CDK8/Cyclin C, das Homolg der Säugetiere, *in vitro* die Transkription hemmen kann, indem sie Cyclin H, den Kofaktor von CDK7, phosphoryliert (Akoulitchev et al., 2000). Im Gegensatz dazu wird Srb10/CDK8 jedoch für die Aktivierung der Transkription von Gal4 und Sip4 benötigt (Hirst et al., 1999; Vincent et al., 2001; Furumoto et al., 2007) und aktiviert die Transkription von p53-Zielgenen (Donner et al., 2007).

Die beiden Hefekinasen Ctk1 und Bur1 wiederum, sind mit der CDK9 der Säugetiere verwandt. Bur1 bildet mit Bur2 ein CDK/Cyclin-Paar (Yao et al., 2000; Keogh et al.,

2003) und spielt eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung von Rad6, das wiederum verantwortlich für die Histon-3-Lysin-4-Methylierung durch den COMPASS-Komplex ist (Wood et al., 2005). Obwohl Bur1 die CTD *in vitro* an ihren Serin-2- und Serin-5-Resten phosphorylieren kann, kommt es in Bur1-mutierten Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der CTD-Phosphorylierung (Keogh et al., 2003). Das zweite CDK9-Homolog, Ctk1, bildet zusammen mit dem Cyclin Ctk2 und einem dritten Protein namens Ctk3 den heterotrimeren CTDK-1-Komplex (Sternier et al., 1995), der die Serin-2-Reste der CTD phosphoryliert (Cho et al., 2001), was wiederum Voraussetzung für eine effiziente Transkriptions-Elongation ist. Sowohl Ctk1 als auch Bur1 gelten als Elongationsfaktoren, da Mutationen beider Enzyme eine Sensitivität gegenüber 6-Azauracil (6-AU) verursachen und beide Proteine mit bekannten Pol II-Elongationsfaktoren wechselwirken (Prelich, 2002). Dennoch ist es wahrscheinlich, dass diese beiden Kinasen unterschiedliche Substrate haben, denn, im Gegensatz zu Bur1, handelt es sich bei Ctk1 nicht um ein essenzielles Gen. CDK9 und sein korrespondierendes Cyclin T sind Bestandteil der katalytischen Untereinheit von P-TEFb, einem positiven Transkriptions-Elongations-Faktor (Price, 2000). P-TEFb kontrolliert während der Transkription den Übergang der Pol II in die produktive Elongation und wird durch die reversible Assoziation mit den RNA-bindenden Proteinen HEXIM1/2 und der 7SK RNA reguliert (Byers et al., 2005). Die Aktivität von CDK9 beendet die Blockade der Transkription, indem es die Spt5-Untereinheit von DSIF phosphoryliert (Price, 2008), wodurch die Bindung von NELF aufgehoben wird. In diesem Prozess spielt die CTD der Pol II eine wichtige Rolle und wird in Säugetieren durch P-TEFb an seinen Serin-2-Resten phosphoryliert (Komarnitsky et al., 2000).

Neben diesen drei CDKs in Säugetieren bzw. vier in der Hefe *S. cerevisiae* wurden in *in vitro*-Experimenten mit CDK1/Cyclin A/B und CDK2/Cyclin E noch zwei weitere Cyclin-abhängige CTD-Kinasen identifiziert, die die Serin-2- und Serin-5-Reste der CTD phosphorylieren können (Gebara et al., 1997; Deng et al., 2002). Im Zellzyklus der Hefe werden die Homologe von CDK1, Cdc2 (*S. pombe*) bzw. Cdc28 (*S. cerevisiae*), benötigt um den Übergang von G1-S nach G2-M zu regulieren. Cdc2 ist an der Koordination Zellzyklus-abhängiger Genexpression beteiligt (Wittenberg and Reed, 2005). CDK1 sorgt während der Mitose für eine Zellzyklus-abhängige Hyperphosphorylierung der Pol II-CTD, wodurch die Expression der Pol II-transkribierten Gene gehemmt wird. Während der M-Phase des Zellzyklus herrscht

also die hyperphosphorylierte, aber inaktive Form der Polymerase vor, während die hypophosphorylierte Form nahezu verschwindet (Bregman et al., 2000). Dabei reicht die aufgereinigte CDK1 samt ihres B-Cyclins aus, um die gesamte Transkription *in vitro* zu hemmen (Long et al., 1998). Die Cdc28 hat aber auch eine aktivierende Wirkung und ist in *S.cerevisiae* essenziell bei der Transkription von Gal1, wobei die Initiation der Transkription auch ohne die Kinase-Aktivität von Cdc28 stattfinden kann (Yu et al., 2005). CDK2/Cyclin E induziert bei der *in vitro*-Transkription des HIV-1-Promotors die Phosphorylierung der CTD, wodurch es zu einer Interaktion zwischen der phosphorylierten CTD und dem Transaktivator-Protein HIV-1 Tat kommt. Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, ob CDK2 auch *in vivo* die CTD phosphoryliert. Wahrscheinlicher ist, dass CDK2 das Tat-Protein phosphoryliert, wodurch die CTD-Kinase CDK9/Cyclin T angeregt wird und somit die CTD indirekt modifiziert (Ammosova et al., 2006).

Abgesehen von den Mitgliedern der CDK-Familie wurden noch andere Kinasen identifiziert, die die CTD der Pol II phosphorylieren können. Diese Kinasen werden meist durch zellulären Stress aktiviert und könnten in dieser Situation die Genexpression der Zelle steuern (Baskaran et al., 1999). So wurde gezeigt, dass die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK 1/2 die CTD direkt phosphorylieren können, wodurch eine neue Form von Rpb1 entsteht. Diese Pol IIM-Form läuft in der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zwischen der hyperphosphorylierten Pol II0- und der hypophosphorylierten IIA-Form (Bonnet et al., 1999). *In vitro* phosphorylieren ERK 1/2 die Serin-5-Reste der CTD, wobei sie weder Konsensus- noch Nicht-Konsensus-Wiederholungen bevorzugen (Trigon et al., 1998). Die CTD-Phosphorylierung durch ERK 1/2 wird in Reaktion auf zellulären Stress wie Hitzeschock oder ionisierender Strahlung induziert (Bonnet et al., 1999). Als Antwort auf eine Beschädigung der DNA durch Doppelstrangbrüche werden mit DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) und ATM (mutiert bei Ataxia telangiectasia) zwei Mitglieder der DNA-PK-Familie aktiviert. Es wurde gezeigt, dass DNA-PK, nicht aber ATM die CTD direkt phosphoryliert (Peterson et al., 1995). ATM wiederum aktiviert die c-Abl-Tyrosinkinase, die über eine spezifische Interaktionsdomäne (CID) an die CTD bindet und diese phosphoryliert (Baskaran et al., 1996).

## 1.7 CTD-Phosphatasen

Die Dynamische Dephosphorylierung der Serin-2- und Serin-5-Reste während des Transkriptionszyklus durch CTD-spezifische Phosphatasen hat einen signifikanten Anteil an der Veränderung des CTD-Phosphorylierungsmusters und ist für das Recycling von Pol II essenziell. In der Hefe wurde gezeigt, dass Fcp1 *in vitro* sowohl Serin-2 als auch Serin-5 dephosphoryliert (Lin et al., 2002), und es wird diesem Enzym eine tragende Rolle beim Recycling der Pol II zugedacht, indem es Serin-2 dephosphoryliert (Hausmann und Shuman, 2002). Weitere Phosphatasen sind Ssu72 in der Hefe und SCP1 in den Säugetieren, die spezifisch Serin-5 dephosphorylieren (Meinhart et al., 2005). *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass Ssu72 ein CTD-Substrat dephosphoryliert, das zuvor von Kin28 phosphoryliert wurde, weshalb spekuliert wird, dass Ssu72 an der Regulation des Übergangs von der Initiation in die produktive Elongation beteiligt sein könnte (Krishnamurthy et al., 2004). Die Hemmung der Ssu72-Aktivität führt zu einem Defekt in der Transkription und zu einem Anstieg der Serin-5-Phosphorylierung (Reyes-Reyes und Hampsey, 2007), was die Auffassung unterstützt, dass diese Phosphatase auch *in vivo* die CTD-Phosphorylierung beeinträchtigt. Bis zum heutigen Tage ist das Wissen über CTD-Phosphatasen im Vergleich zu CTD-Kinasen viel geringer, und der exakte Mechanismus der Regulation ist weiterhin unklar.

Die Aktivität der angeführten CTD-Kinasen und Phosphatasen kann durch die Anwesenheit CTD-assoziiierter Faktoren, durch vorangegangene Phosphorylierungsereignisse und die Wirkung genspezifischer Transkriptions-Regulatoren beeinträchtigt werden, wodurch eine enorme Komplexität entsteht. Bei der Vielzahl an potenziellen CTD-modifizierenden Enzymen, der Komplexität ihres Substrats selbst und der Diversität an CTD-Funktionen ist es wenig überraschend, dass, obwohl die wichtige Rolle der CTD-Kinasen bei der Ablösung vom Promotor, der Elongation und der Prozessierung der Prä-mRNA klar ist, die exakte Wirkungsweise immer noch offen ist. Die Veränderungen der CTD-Phosphorylierung als Antwort auf Zellzyklus-regulatorische Ereignisse und extrazelluläre Reize zeigen, dass die CTD dazu dient, verschiedene Signalwege zu verflechten, die die Transkription entweder global oder Promotor-spezifisch beeinflussen (Oelgeschlager, 2002). Es wird zukünftig eine große Herausforderung sein, die unterschiedlichen

Signalwege aufzudecken, die relevanten CTD-modifizierenden Enzyme zu identifizieren und ihre genaue Wirkungsweise zu offenbaren.

### 1.8 Aufgabenstellung

Die CTD der RNA-Polymerase II besteht aus 26 (*S. cerevisiae*) bis 52 Wiederholungen (*H. sapiens*) der Konsensussequenz  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ . Diese ungewöhnliche Heptapeptid-Sequenz besteht ausschließlich aus modifizierbaren Aminosäureresten. Es ist zwar bekannt, dass die CTD an Prozessen, wie der Transkriptions-Initiation, RNA-Elongation und der Rekrutierung wichtiger Faktoren für die mRNA-Prozessierung, die Ausbildung der 5'-Cap-Struktur, das Spleißen und die 3'-Prozessierung beteiligt ist, ihre exakte Rolle aber ist, selbst 20 Jahre nach ihrer Entdeckung, immer noch nicht vollständig geklärt. Welche Modifikationen die CTD zu welchem Zeitpunkt in welcher Kombination trägt ist daher weiterhin ein Mysterium. Selbst die Untersuchungen zur Phosphorylierung der Serin-2- und Serin-5-Reste konnten bisher nicht eindeutig belegen, in wie vielen der 52 möglichen Wiederholungseinheiten diese Modifikationen *in vivo* vorkommen und ob sie dabei nur einzeln oder auch zusammen im selben Heptad auftreten. Das Ziel dieser Arbeit war es, alle Aminosäuren des Heptads auf ihr Modifikations-Potenzial zu überprüfen und ihre Bedeutung hinsichtlich der Transkription zu definieren. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die neuentdeckten Phosphorylierungen von Threonin-4 und Serin-7 gelegt. Welche Rolle spielen diese Modifikationen während des Transkriptionszyklus oder bei der spezifischen Expression bestimmter Gene als Antwort der Zelle auf Stress-Reize, und welche Enzyme sind für die Etablierung dieser Modifikationen verantwortlich?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

$\alpha$ -Amanitin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Bromphenolblau (BPB)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
DMEM Medium	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
DMSO (Dimethylsulfoxid)	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
DRB (5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-Benzimidazol)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Ethylendiamine-tetraacetic acid (EDTA)	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
Flavopiridol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Glycerol 86%	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
Glycin	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
L-Glutamin 200mM (100x)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Magermilchpulver	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
Methanol	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natrium-Deoxycholat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Natrium-Pyrophosphat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Neomycin (G 148)	<i>Promega Corp., Wisconsin, USA</i>
PD 98059	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Phenol	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	<i>ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt/Main</i>
Polyacrylamid 30% (PAA)	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
RPMI Medium 1640	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
D-Sorbitol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
TEMED	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
Tetracyclin	<i>Promega Corp., Wisconsin, USA</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>

(Tris/Base)

Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Tween 20	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
U 0125	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Wasserstoff-Peroxid	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>

### **2.1.2 Geräte**

Biofuge 13	<i>Heraeus Sepatech GmbH, Osterode</i>
Bio-Rad PowerPac 300	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Eppendorf Centrifuge 5417R	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Eppendorf Thermomixer 5436	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Flow-Hood-Sicherheitwerkbank	<i>BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen</i>
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	<i>GLW mbH, Würzburg</i>
Inkubator für Zellkultur Heraeus 6000	<i>Heraeus Sepatech GmbH, Osterode</i>
KS 250 Basic Schüttler	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Dispergiergerät	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Hypercassette	<i>GE Healthcare, München</i>
M23 Magnetprüher	<i>GLW mbH, Würzburg</i>
Megafuge 2.0	<i>Heraeus Sepatech GmbH, Osterode</i>
Multi-Calimatic pH-Meter	<i>Knick, Berlin</i>
Odyssey Infrared Imaging System	<i>Odyssey LI-COR, Nebraska, USA</i>
SDS-PAGE-Laufkammer Mighty Small	<i>GE Healthcare, München</i>
Sonicator	<i>Heinemann, Schwäbisch Gmünd</i>
Stuart <sup>R</sup> Rollermixer SRT 2	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
RTCA Analyzer	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
RTCA SP Station	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
RTCA Control Unit 1.1	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
ST305 Electrophoresis Power Supply	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
Telaval 31 Lichtmikroskop	<i>Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen</i>
TE Series Transphor Electrophoresis Unit	<i>Hofer, Massachusetts, USA</i>
Vortexer Vortex Genie 2	<i>Bender &amp; Hobein GmbH, Ismaning</i>
Wasserbad	<i>Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe</i>



### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

6-Well Zellkulturschale	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>
96-Lochplatte	<i>Nunc GmbH, Wiesbaden</i>
Cryovials 1,5ml	<i>Nunc GmbH, Wiesbaden</i>
ECL™-Kit	<i>GE Healthcare, München</i>
Falcon Reaktionsgefäße 15ml	<i>Becton Dickinson Labware,</i>
Falcon Reaktionsgefäße 50ml	<i>Becton Dickinson Labware,</i>
Fugene <sup>R</sup> HD Transfection Reagent	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Hybond-ECL; Nitrocellulose-Membran	<i>GE Healthcare, München</i>
Hyperfilm ECL	<i>GE Healthcare, München</i>
Oligofectamin	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Parafilm	<i>Carl Roth GmbH&amp;CoKG, Karlsruhe</i>
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Pipettenspitzen, D 1000	<i>Gilson, Wisconsin, USA</i>
Pipettenspitzen, D 200	<i>Gilson, Wisconsin, USA</i>
Pipettenspitzen, D 10	<i>Gilson, Wisconsin, USA</i>
Pipettenspitzen gestopft, Art 1000	<i>Molecular Bio-Products, San Diego</i>
Pipettenspitzen gestopft, Art 200	<i>Molecular Bio-Products, San Diego</i>
Pipettenspitzen gestopft, Art 20	<i>Molecular Bio-Products, San Diego</i>
Pipettenspitzen gestopft, Art 10	<i>Molecular Bio-Products, San Diego</i>
Protease-Inhibitor-Cocktail	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Protein-A-Sepharose-Beads	<i>GE Healthcare, München</i>
Protein-G-Sepharose-Beads	<i>GE Healthcare, München</i>
Reaktionsgefäße 1,5ml	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Reaktionsgefäße 2ml	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Zellkulturflaschen 50ml	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>
Zellkulturflaschen 250ml	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>
Zellkulturflaschen 650ml	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>
Zellkulturschale (Ø 10cm)	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>
Zellkulturschale (Ø 15cm)	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>

## 2.1.4 Antikörper

### Primärantikörper:

Zielprotein	Name/Klon	Verteiler	Spezies
Rpb1-CTD	8WG16	E.Kremmer	Maus
Anti-HA High Affinity	3F10	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>	Ratte
CDK2	Sc-163	<i>Santa Cruz, Santa Cruz/USA</i>	Kaninchen
CDK5	YD032402	<i>Epitomics, Burlingame/USA</i>	Kaninchen
CDK7	MO-1.1	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>	Maus
CDK8	Sc-13155	<i>Santa Cruz, Santa Cruz/USA</i>	Maus
CDK9	Sc-484	<i>Santa Cruz, Santa Cruz/USA</i>	Kaninchen
CTD	1C7-1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
CTD Ser2-P	3E10-1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
CTD Ser2/5-P	3H7-1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
CTD Ser5-P	3E8-2	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
CTD Ser7-P	4E12-1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
CTD Thr4-GlcNAc	5C7-1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
CTD Thr4-P	6D7-1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
CTD Tyr1-P	5G9-1.1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
ERK1/2	9101	<i>CST, Boston/USA</i>	Kaninchen
ERK1/2-P	9102	<i>CST, Boston/USA</i>	Kaninchen
GSK3 $\beta$	SC-9315	<i>Santa Cruz, Santa Cruz/USA</i>	Kaninchen
MAPKAPK5	C62049	<i>LifeSpan Biosciences, Seattle/USA</i>	Maus
PES1	6H11-1.1.1	E.Kremmer/D.Eick	Ratte
Pol II Rpb1	POL-3-3	<i>E. Bautz/Heidelberg</i>	Maus
Pol II Rpb3 (Hefe)	1Y26	<i>Neoclone, Madison/USA</i>	Maus

### **Sekundärantikörper:**

$\alpha$ -IgG Kaninchen, HRP-gekoppelt	<i>Promega Corp., Wisconsin, USA</i>
$\alpha$ -IgG Maus, HRP-gekoppelt	<i>Promega Corp., Wisconsin, USA</i>
$\alpha$ -IgG Ratte, HRP-gekoppelt	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Alexa Fluor 680 Goat $\alpha$ -Mouse IgG (H+L)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Alexa Fluor 680 Goat $\alpha$ -Rat IgG (H+L)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
IR Dye 800 CW $\alpha$ -Rat IgG (H+L)	<i>Rockland Inc, Rockland</i>
IR Dye 800 CW $\alpha$ -Mouse IgG (H+L)	<i>Rockland Inc, Rockland</i>

### **2.1.5 Peptide**

Die CTD-Peptide und CKT-Peptide wurden von Dr. Hans-Richard Rackwitz synthetisiert (*Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg*). Sequenz siehe Abb. 3 (Ergebnisteil).

### **2.1.6 Plasmide**

Die Strategie zur Herstellung und Klonierung der verwendeten Plasmide wurde von Dr. Rob Chapman entworfen (Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2007). Für die Produktion der CTD-Mutanten wurde ein Vektor modifiziert, der Exon 29 von Pol II-Rpb1 enthält (pUC19-CTD). Durch PCR-Mutagenese wurden einmalige Schnittstellen in pUC19-CTD eingeführt: *BspEI* in Intron-28 (Primer G, 5'-CATGTTTGTATGTCCGGAGCTTCACCAAC-3' und Primer H, 5'-GTTGGTGAAGCTCCGGACATACAAACATG-3'); *AgeI* in Intron-28 (Primer I, 5'-CATGTTTGTATGACCGGTGCTTCACCAAC-3', und Primer J, 5'-GTTGGTGAAGCACCGGTCATACAAACATG-3'); *AvrII* in Exon-29, Wiederholung 2 (Primer K, 5'-CCTATAGGTGTGCTATGTCTCCTAGGTAACCGACATCACCAGCC-3', und Primer L, 5'-GGCTGGTGATGTCGGTGAGTACCTAGGAGACATAGCACCCACCTATAGG-3'); *NheI* in Exon-29, Wiederholung 3 (Primer M, 5'-GCTATACACCCCAGAGCCCCGCTAGCTACTCCCCTACTTCACC-3', und N, 5'-GGTGAAGTAGGGGAGTAGCTAGCGGGGCTCTGGGGTGTATAGC-3').

Dazu wurden 0,1µg des Plasmids in 18 Zyklen durch *Pfu*-Polymerase (Promega) und dem jeweiligen Primer-Paar amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde *DpnI* verdaut, Hitze-inaktiviert und direkt in Bakterien transfiziert. Die angewandte Klonierungs-Strategie verwendete Erkennungssequenzen von isoschizomeren Enzymen, deren Schnittstellen zerstört wurden, sobald sie zusammengefügt wurden. Die Wahl der verwendeten Enzyme hatte keinerlei Veränderungen in der Aminosäuresequenz der CTD zur Folge. Die Mutanten wurden dann entweder in einen Tetracyclin-regulierten Vektor (Chapman et al., 2004), oder durch Entfernung der mutierten CTD mit *BspEI* und *NotI* über die neue *AgeI*-Schnittstelle in Intron-28 und *NotI*-Schnittstelle in Exon-29 eingefügt. Die synthetischen CTDs wurden hergestellt, indem ein Linker, zusammengestellt aus den Primern T (5'-CTAGCTACAGCCCTACCTCTCC-TAGCTACTCGCCACCTCCCCTAGCTACTCGCCAACCTCTCCTTCTATTCTCC-AACATCACCTAGGGATGAGGAG-AACTGAC-3') und U (5'-CTTGGTCAGTTCTCC-TCATCCCTAGGTGATGTTGGAGAATAGGAAGGAGAGGTTGGCGAGTAGCTAGG-GGAGGTGGGCGAGTAGCTAGGA-GAGGTAGGGCTGTAG-3'), zwischen den Schnittstellen *NheI* und *StyI* eingefügt wurde. Zur Herstellung der CTD-Austausch- und Längen-Mutanten wurde pUC19-CTD mit *NheI* und *StyI* geschnitten und ein synthetischer Linker mit der jeweiligen Mutation eingefügt. Die, in den Linkersequenzen enthaltenen, Schnittstellen für *NheI*-Isoschizomere (*AvrII* und *SpeI*) ermöglichten die sequenzielle Klonierung von Multimeren von (*NheI*-*Clal*) zurück in den selben Vektor (*SpeI*-*Clal*), wodurch die Anzahl der Wiederholungen bei jedem Schritt verdoppelt wurde. Die Erhöhung der Anzahl der CTD-Wiederholungen wurde also durch das wiederholte Klonieren eines *NheI*-*Clal*-Fragments (= vier CTD-Wiederholungen) von dem resultierenden Vektor über *AvrII*-*Clal* bzw. *SpeI*-*Clal* zurück in sich selbst erreicht. Die letzte Wiederholungseinheit, CTD 52, wurde an die synthetischen Mutanten in Form eines Linkers angefügt (Primer V, 5'-CTAGCTACAGCCTCACCAGCCCAGCCATCAGCCCAGATGACAGCGATGAGGAG-AACTGAGC-3', und Primer W, 5'-GGCCGCTCAGTTCTCCTCATCGCTGTCATCTGGGCTGATGGCTGGGCTGGTGTAGG-CTGTAG-3'). Für die Expression in 293-Zellen wurden die Sequenzen als *NgoMIV* und *Clal*-Fragmente von ihrem pUC19-CTD-Subklon entfernt und zwischen die *NgoMIV* und *Clal*-Schnittstellen des konstitutiven Expressionsvektors pSTC-TK HA Pol II LS\* (Gerber et al., 1995) eingefügt.

### 2.1.7 SiRNA-Sequenzen

Name	Sequenz	Zielprotein	Referenz/Verteiler
siLuc	5'-CGTACGCGGAATACTTCGAdTdT-3'	Luciferase	MWG/Eurofins
siCdk2	5'-AAGGTGGTGGCGCTTAAGAAAdTdT-3'	CDK2	Tetsu et al., 2003
siCdk5	5'-GAGGATCTTTCGACTGCTAdTdT-3'	CDK5	Meuer et al., 2007
siCdk7	5'-GCCTACATGTTGATGACTCdTdT-3'	CDK7	Wohlbold et al., 2006
siCdk8	5'-CTACAAAGCCAAGAGGAAAdTdT-3'	CDK8	Furumoto et al., 2007
siCdk9-1	5'-TAGGGACATGAAGGCTGCTAAAdTdT-3'	CDK9	Pirngruber et al., 2009
siCdk9-2	5'-GCAAGGGTAGTATA-TACCTGGTGTtdTdT-3'	CDK9	Pirngruber et al., 2009
siGSK3-1	5'-AGAAAGTATTGCAGGACAAdTdT-3'	GSK3 $\beta$	Kaspar Burger
siGSK3-2	5'-CTGTCTTGAAGGAGAAATAdTdT-3'	GSK3 $\beta$	Kaspar Burger

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

2xTris/SDS pH8,8

22,68g Tris/Base  
2,5ml SDS 20%  
ad 250ml H<sub>2</sub>O  
pH-Einstellung mit HCl

2xTris/SDS pH6,8

7,56g Tris/Base  
2,5ml SDS 20%  
ad 250ml H<sub>2</sub>O  
pH-Einstellung mit HCl

## Material und Methoden

---

FA-Lysispuffer	50mM HEPES-KOH, pH 7,5 150mM NaCl 1mM EDTA 1% Triton X-100 0,1% Na-Deoxycholat
Lämmli-Puffer (2x)	2% SDS 100mM DTT 10mM EDTA 10% Glycerol 60mM Tris/HCl pH 6,8 0,01% BPB 1mM PMSF
LCW-Puffer	0,5% Triton-100 0,5% Na-Deoxycholat 150mM NaCl 20mM Tris pH 7,5 10mM EDTA 30mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1xPhosphatase-Inhibitor-Mix 1xProtease-Inhibitor-Mix
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/Tween	99,9% (v/v) PBS 0,1% (v/v) Tween 20

## Material und Methoden

---

Sammelgel (3%)	1,5ml PAA 30% 7,5ml 2xTris/SDS pH 6,8 5,9ml H <sub>2</sub> O 90µl APS 20µl TEMED
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	60,4g Tris/Base 288g Glycin 5ml SDS 20% ad 2l H <sub>2</sub> O
TBS (Tris-gepufferte Saline)	150mM NaCl 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
TE (Tris-EDTA)	10mM Tris-HCl, pH 8.0 1mM EDTA
Trenngel (6,5%)	8,6ml PAA 30% 20ml 2xTris/SDS pH 8,8 11ml H <sub>2</sub> O 334µl APS 20µl TEMED
Western-Transferpuffer (10x)	60,4g Tris/Base 288g Glycin 5ml SDS 20% 200ml Methanol ad 2l H <sub>2</sub> O
Western-Blocking-Reagenz	10% (v/v) TBS 0,1% (v/v) Tween 20 5% (w/v) Magermilchpulver

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien H9, HFB und Neural Precursor wurden von Dr. Fang Wan (Universität von Wisconsin/Madison) kultiviert. Die fertigen Gesamtzell-Lysate dieser Linien wurden mir für Western-Analysen zur Verfügung gestellt (siehe Abschnitt 3.1.1).

#### **Suspensions-Zellen:**

Sowohl die Wildtyp-, als auch die transfizierten Raji-Zellen wuchsen in Suspensionskultur bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub>-haltigen, wasserdampfgesättigten Atmosphäre und wurden in RPMI-Medium gehalten (10% FCS, 100U Penicillin/ml, 100µg Streptomycin/ml und 2mM L-Glutamin. Das Medium der transfizierten Zellen enthielt zusätzlich 0,1µg Tetracyclin/ml und 1mg G418/ml.). Das optimale Wachstum wird bei einer Dichte von ca. 300000 Zellen/ml erreicht. Dies wurde erhalten, indem die Suspension alle drei Tage mit frischem Medium 1:3 geteilt wurden.

Um die Expression der verschiedenen rekombinanten RNA-Polymerasen zu induzieren, musste das Tetracyclin ausgewaschen werden. Dazu wurden die Zellen bei 1500rpm für 5min abzentrifugiert und anschließend fünfmal mit 20ml PBS/1% FCS gewaschen, bevor sie in 10ml Wachstumsmedium resuspendiert wurden. 24h nach Induktion wurde  $\alpha$ -Amanitin (Stocklsg.: 1mg/ml in H<sub>2</sub>O) in einer finalen Konzentration von 2µg/ml zugegeben, um die endogene Pol II zu hemmen. Die Proteinextrakte wurden 24h nach der Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin vorbereitet.

#### **Adhärente Zellen:**

Die adhärenen Zellen der Linien HEK 293, MEF, NIH 3T3, U2OS wuchsen bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 8% (5% bei HEK 293 Zellen) CO<sub>2</sub>-Partialdruck und wurden in DMEM-Medium gehalten (10% FCS, 100U Penicillin/ml, 100µg Streptomycin/ml und 2mM L-Glutamin).



Um die verschiedenen rekombinanten Pol II transient zu exprimieren, wurden 5000 HEK 293-Zellen pro 96-Well in einem Volumen von 150µl DMEM ausplattiert. Nach 24h wurden die Zellen mit 2µg Plasmid-DNA pro 8µl Transfections-Reagenz transfiziert. Nach weiteren 24h wurde  $\alpha$ -Amanitin (Stocklsg.: 1mg/ml in H<sub>2</sub>O) in einer finalen Konzentration von 2 µg/ml zugegeben, um die endogene Pol II zu hemmen. Um die Zellviabilität festzustellen wurde der Zellindex mit Hilfe des xCelligence-Systems fortlaufend für 120h aufgezeichnet (Heidemann, 2009).

### **2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Um die Lebendzellzahl in einem bestimmten Volumen zu bestimmen wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung (w/v in PBS) vermischt. Lebendige Zellen nehmen diesen Farbstoff nicht auf (farblos), während ihn tote Zellen über ihre poröse Membran aufnehmen und daher blau angefärbt werden. Die prozentuale Lebensfähigkeit ergibt sich aus der Formel  $100 \times (\text{Lebendzellzahl}/\text{Gesamtzellzahl})$ .

### **2.2.1.3 Aufbewahrung der Zellen**

Um die Zellen zu lagern können sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Hierzu wurden  $1 \times 10^7$  Zellen bei 1500rpm für 5min abzentrifugiert, das Zellpellet in 1ml Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und in ein 1,5-ml-Cryovial überführt. Um ein Schockgefrieren der Zellen zu vermeiden, wurden die Boxen mit mehreren Lagen Zellstoff umwickelt und im  $-80^{\circ}\text{C}$ -Schrank eingefroren. Danach konnten sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Um eingefrorene Zellen wieder zu kultivieren, wurden die Cryovials 5min bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 30ml frisches Wachstumsmedium überführt und mehrmals gemischt. Darauf wurden die Zellen bei 1500rpm für 5min abzentrifugiert und in 10ml Wachstumsmedium mit 20% FCS aufgenommen, um das schädliche DMSO zu entfernen.

## 2.2.2 Western-Analyse

### 2.2.2.1 Lyse der Säugetier-Zellen

Die Raji-Zellen wurden bei einer ungefähren Dichte von  $6 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter geerntet, das heißt es wurde ca. jeweils ein Milliliter in ein Eppendorfgesäß überführt und bei 3000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mittels einer Pipette abgenommen und das Zellpellet in 20µl PBS resuspendiert. Dann wurden 200µl 2x Lämmli-Puffer hinzugegeben und die Proben schnell auf- und abpipettiert bis die Konsistenz der Proben wieder dünnflüssig war.

Adhärente Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70% geerntet. Hierzu wurden das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 100µl Lämmli-Puffer pro 6-Lochplatte bzw. 500µl pro 10cm-Zellkulturplatte direkt auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgekratzt.

Die Lysate wurden dann drei Minuten bei 100°C aufgekocht, kurz abzentrifugiert und danach auf ein Acrylamidgel geladen bzw. bei -20°C weggefroren.

### 2.2.2.2 Lyse der Hefe-Zellen

Es wurden folgende Stämme für die Analyse mittels Westernblot verwendet:

*S. cerevisiae*: BY4741

*S. pombe*: 972 H

Die Herstellung der Westernlysate erfolgte bei beiden Stämmen auf die gleiche Art und Weise:

50ml Hefekultur wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.8 wachsen gelassen (log-Phase). Die Zellen wurden abzentrifugiert und zweimal mit kaltem TBS (+Phosphatase-Inhibitoren: 1mM  $NaN_3$ , 1mM NaF, 0.4mM  $Na_3VO_4$ ) und zweimal mit eiskaltem FA-Lysispuffer mit 0,1% SDS (Phosphatase- und Protease-Inhibitoren: 1mM Leupeptin, 2mM Pepstatin A, 100mM PMSF, 280mM Benzamidin) gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zum Aufschluss wurde das Pellet in 1ml FA-Lysispuffer mit 0,1% SDS resuspendiert und durch Vortexen für zehnmal 3min mit 500µl Glasperlen (Durchmesser 212-300µm) lysiert. Danach wurden die Proben für 30min abzentrifugiert (4°C, 16400rpm), der Überstand aliquotiert und

weggefroren. Für die Westernanalyse wurden die Proben auf Eis aufgetaut, 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer gemischt, 3min aufgekocht und dann je 4µl pro Spur geladen.

### **2.2.2.3 Herstellung der Mausgewebe-Proben**

Die einzelnen Organe wurden einer frisch getöteten Wildtyp-Maus entnommen, kurz in kaltem PBS gewaschen, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Herstellung der Lysate wurde das jeweilige Organ in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und 1ml LCW-Puffer zugegeben. Dann wurde die Probe homogenisiert (5 Sekunden bei maximaler Stufe). Danach erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen. Danach wurden die Lysate viermal für 15 Sekunden sonifiziert (Output 4; Duty Cycle 50%) und für 30min bei 4°C abzentrifugiert (16400rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dann die Gesamtproteinkonzentration photometrisch gemessen. Zur Untersuchung per Western-Analyse wurden die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mit Wasser angeglichen und die Proben dann mit Lämmli-Puffer versetzt und 3 min bei 95°C aufgekocht, bevor sie aufs Gel aufgetragen wurden.

### **2.2.2.4 SDS-PAGE und Transfer**

Die Proteinproben wurden 3min aufgekocht, kurz abzentrifugiert und danach 20µl in die Geltaschen geladen. Die Proben für ca. 2,5h bei 30mA pro Gel aufgetrennt. Der Transfer auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 450mA über 90min. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit H<sub>2</sub>O gespült und dann für 30 bis 60min in Western-Blocking-Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in 50-ml-Falcons überführt und, nachdem 5ml Western-Blocking-Reagenz mit Primärantikörper(n) (Verdünnung der Primärantikörperüberstände 1:10, kommerzielle Antikörper nach Anweisung) hinzugefügt wurden, bei 4°C auf einem Rollermixer über Nacht inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal für je 5min in TBST gewaschen, um Milch und Primärantikörper zu entfernen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte dann 2h lang bei Raumtemperatur. Darauf folgte wieder eine dreimalige Spülung mit H<sub>2</sub>O und dreimaliges Waschen in TBST. Da

TBST die ECL-Reaktion hemmt, mussten die Membranen danach wieder dreimal mit Wasser gespült werden.

Die Membranen wurden dann, je nachdem, mit einem 1:1-Gemisch der beiden ECL-Reagenzien beträufelt und ein Film aufgelegt bzw. wurden die noch feuchten Membranen über das Odyssey-Licor-Gerät eingelesen.

### **2.2.3 Immunpräzipitationen**

50µl Protein Sepharose-G-Beads wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 500µl Antikörper-Überstand für 4h bei 4°C auf dem Rollermixer inkubiert.

Die Raji-Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in LCW-Puffer aufgenommen und lysiert (100µl LCW pro  $3 \times 10^6$  Zellen). Nachdem das Lysat in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt wurde, erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen. Danach wurden die Lysate zweimal für 15sek sonifiziert (Output 4; Duty Cycle 50%) und für 30min bei 4°C abzentrifugiert (16400rpm). 50µl des Lysats wurden mit 50µl 2xLämmli-Puffer versetzt und als Input-Kontrolle verwendet. 50µl Antikörper-gekoppelte Protein-Sepharose-G-Beads wurden dreimal mit LCW-Puffer gewaschen und dann zu je 100µl des Lysats gegeben, das Gesamtvolumen mit LCW-Puffer auf 1ml aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollermixer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads abzentrifugiert (4°C; 2min; 2000rpm) fünfmal mit LCW-Puffer gewaschen. Dann wurden die Beads in 50µl LCW-Puffer aufgenommen, 50µl 2xLämmli zugesetzt und für 7min bei 95°C aufgeköcht um das Protein zu eluieren. Danach erfolgte die Untersuchung mittels Western-Analyse.

### **2.2.4 *In vitro*-Untersuchungen der rekombinanten Kinasen**

Bei der Untersuchung der Hefekinasen wurden als Substrat (200ng) entweder die aufgereinigten Peptide GST-TS 16 (16 Wiederholungen YSPTSPS, gekoppelt mit GST), GST-TS 04 (4 Wiederholungen YSPTSPS, gekoppelt mit GST), S2A (Serin-2 ist in allen 4 Wiederholungen in ein Alanin umgewandelt), S5A (Serin-5 ist in allen 4 Wiederholungen in ein Alanin umgewandelt) oder S7A (Serin-7 ist in allen 4 Wiederholungen in ein Alanin umgewandelt) verwendet. Die Kinase-Experimente wurden in einem Reaktionsvolumen von 25µl bei 25°C für 2h durchgeführt (Reaktionspuffer: 20mM HEPES [pH 7,5]; 2,5mM EGTA; 15mM Magnesium-Acetat;

0,8mM ATP; 10% Glycerol; Protease- und Phosphatase-Inhibitoren [1mM NaN<sub>3</sub>; 1mM NaF; 0,4mM Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub>]. 4µl des Reaktionsgemischs wurden direkt auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht. Danach wurde wie bei der Western-Analyse verfahren.

Für die Quantifizierung mittels ELISA wurde das CTD-Peptid TS 04 an 96-Well-Maleimid-Platten gekoppelt und für 60min bei 37°C in Carbonat-Puffer (pH 9,5) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Kinase-Experiment unter Verwendung von 100ng rekombinanter Kinase, sowohl bei der Untersuchung der Säugetier- (gekauft bei *Proqinase GmbH, Freiburg*) als auch der Hefe-Kinasen (Geschenk von Prof. Dr. Steven Hahn, Seattle), in 25µl Reaktions-Puffer (20mM TrisCl [pH 7,4]; 20mM NaCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 1µM DTT und 2µM ATP) bei 28°C für 60min durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde 30min mit PBS/Milch (1%) geblockt. Die Inkubation mit den Primär-Antikörpern erfolgte 30min lang. Nach einem zusätzlichen Wasch- und Blockschrift wurden Biotin-gekoppelte Sekundär-Antikörper zugegeben und 30min inkubiert. Nach einem weiteren Wasch- und Blockschrift wurde Peroxidase-gekoppeltes Avidin zugegeben. Nachdem 5mal hintereinander mit PBS gewaschen wurde, wurden 50µl des Substrat-Puffer (enthält O-Phenyl-Diamin und Wasserstoff-Peroxid; pH5) zugegeben. Nach dem folgenden Farbumschlag wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 405nm im ELISA-Lesegerät gemessen.

Bei den Inhibitions-Experimenten mit der Analog-sensitiven Kinase, wurde diese noch vor der Reaktion für 5min mit dem Inhibitor 1-NA-PP1 (6µM) oder dem synthetischen ATP-Analog N<sup>6</sup>-Benzyl-ATP inkubiert.

### **2.2.5 SiRNA-Transfektion**

Für den „Knockdown“ der jeweiligen Kinasen wurden 24h vor der Transfektion ca. 100000 Zellen pro 6-Well Zellkulturschale ausplattiert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 1,5ml OPTIMEM-Medium inkubiert. Pro Transfektionsansatz wurden nun 3µl Oligofectamin in 150µl OPTIMEM aufgenommen und vermischt (A). Parallel wurden die jeweiligen siRNAs ebenfalls in 150µl OPTIMEM aufgenommen (B; Endkonzentration 100nM). Die Proben wurden gemischt und 3min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde je ein

Ansatz A mit einem Ansatz B gemischt (Gesamtvolumen 300 $\mu$ l) und für 25min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 600 $\mu$ l OPTIMEM zugegeben, die 1,5ml Medium von den Zellen abgenommen und der Transfektionsansatz (900 $\mu$ l) für 6h auf die Zellen gegeben. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel auf DMEM (10% FCS, 100U Penicillin/ml, 100 $\mu$ g Streptomycin/ml und 2mM L-Glutamin). 24h später erfolgte eine zweite Transfektion, identisch der ersten. Die Probennahme erfolgte in Zeitintervallen nach der zweiten Transfektion.

### 2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation

50ml Hefekultur wurden in YPD-Medium (pro Liter Wasser: 10g Pepton; 20g Hefeextrakt; 2% Dextrose) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wachsen gelassen (log-Phase) und dann durch die Zugabe von Formaldehyd 20min bei Raumtemperatur fixiert (Finale Konzentration 1%). Bei Experimenten mit der Analog-sensitiven Kin28 wurde 20 min vor dem „Crosslink“ 2 $\mu$ M 1-NA-PP1 und 4 $\mu$ M 1-NM-PP1 zugegeben. Die Crosslink-Reaktion wurde durch die Zugabe von Glycin (Finale Konzentration 125mM) für 5 min bei RT abgestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen und einmal in FA-Lysispuffer mit 0,1% SDS. Das Zellpellet wurde dann in 1ml FA-Lysispuffer mit 0,5% SDS resuspendiert und durch Vortexen für zweimal 30min, mit halbstündiger Unterbrechung auf Eis, mit 500 $\mu$ l Gasperlen (Durchmesser 212-300 $\mu$ m) lysiert. Das Lysat wurde in 6,5ml FA-Lysispuffer mit 0,1% SDS aufgenommen und für 20min ultrazentrifugiert (45000rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 8ml FA-Lysispuffer (0,1%SDS) resuspendiert und nochmals ultrazentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 1,5ml FA-Lysispuffer (0,1% SDS) aufgenommen und das Chromatin durch Sonifizierung in eine Fragmentgröße von 200-500 Basenpaare gesichert. Nach einer weiteren Ultrazentrifugation wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Immunpräzipitation wurde mit 750 $\mu$ l quervernetztem Chromatin durchgeführt. Die Proben wurden dazu über Nacht bei 4°C auf dem Roller mit 30 $\mu$ l Sepharose-G-Beads und dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Die Proben wurden am nächsten Tag je einmal mit 1,2ml der folgenden Puffer gewaschen: 1. FA-Lysispuffer/275mM NaCl/0,1% SDS, 2. FA-Lysisbuffer/500mM NaCl/0,1% SDS, 3. 10mM Tris-HCl pH8,0/0,25M LiCl/1mM EDTA/0,5% NP-40/0,5% Na-Deoxycholat, und 4. TE.

Das Chromatin wurde dann durch Inkubation in 200µl 50mM Tris pH7,5/1mM EDTA/1% SDS bei 65°C für 10min von den Sepharose-Beads eluiert. Dann wurden 20µl Pronase (10mg/ml; *Roche, Penzberg*) zugefügt und der Überstand für 1h bei 42°C inkubiert. Danach folgte eine 5 stündige Inkubation bei 65°C um den Crosslink zurückzunehmen. Die DNA wurde dann durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1) gereinigt und in 100%igem Ethanol (2,5faches Volumen) mit 20µg Glykogen präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in 200µl TE-Puffer resuspendiert. Die Input-Proben wurden gleich behandelt.

Input- (2ml) und IP-Proben (Material entspricht ca. 2/3 eines 750µl Aliquots) wurden durch Ligations-vermittelte PCR vervielfältigt und markiert. Die DNA-Proben wurden mit T4 DNA-Polymerase behandelt und an die Primer LMPCR1 (5'-dGCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3') und LMPCR2 (5'-dGAATTCAGATC-3') ligiert. Die Amplifizierung wurde mit dem Primer LMPCR1 in zwei Schritten mit je 15 Zyklen erreicht. Die Produkte wurden nach und zwischen diesen Schritten mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt, wodurch am Ende 3-5µg DNA von den Input- und IP-Proben gewonnen wurde. Die amplifizierten Proben wurden dann Cy3- (Input) bzw. Cy5- (IP) markiert und gegen Nimblegen-Microarrays hybridisiert, die ca. 380000 Merkmale des Hefegenoms abdecken (Tietjen et al., in Revision). Die Analyse der Microarray-Daten erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ansari nach Standardtechnik (Steinmetz et al., 2006).

### 3. Ergebnisse

Die carboxy-terminale Domäne (CTD) der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II besteht aus sich wiederholenden Heptapeptiden mit dem Konsensus-Motiv Tyrosin-1-Serin-2-Prolin-3-Threonin-4-Serin-5-Prolin-6-Serin-7. Jede einzelne dieser Aminosäuren könnte während des Transkriptionszykluses modifiziert werden, jedoch sind bisher nur die Phosphorylierungen der Serine an Position 2 und 5 dieser Wiederholungseinheiten gut charakterisiert. Der unterschiedliche Phosphorylierungsstatus von Serin-2 und Serin-5 koordiniert in den 5'- und 3'-Bereichen von Genen die Rekrutierung und Lokalisation von Transkriptions- und RNA-Prozessierungsfaktoren an den elongierenden Polymerase-Komplex. Dennoch ist bis heute unbekannt in welcher Kombination diese Modifikationen innerhalb der CTD einer bestimmten Polymerase bzw. innerhalb einer Wiederholungseinheit vorliegen. Außerdem ist bislang unklar welche weiteren CTD-Modifikationen, in den Konsensus- wie in den Nicht-Konsensus-Wiederholungen, existieren und welchen Einfluss diese auf den Transkriptionszyklus haben könnten.

#### 3.1 Die monoklonalen CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper

Im ersten Kapitel möchte ich daher meine Bemühungen zur Herstellung und Charakterisierung von Werkzeugen beschreiben, die helfen sollen, dieser Fragestellung zu begegnen.

Hierzu wurden monoklonale Antikörper gegen jede einzelne potentielle Phosphorylierungsstelle innerhalb des Heptapeptids ( $\alpha$ Tyr1-P,  $\alpha$ Ser2-P,  $\alpha$ Thr4-P,  $\alpha$ Ser5-P und  $\alpha$ Ser7-P), sowie gegen die Serin-2- und Serin-5-Doppelphosphorylierung innerhalb der selben Wiederholungseinheit hergestellt ( $\alpha$ Ser2/5-P). Hierzu wurden frühere Erkenntnisse berücksichtigt, dass die funktionelle Einheit der CTD nicht eine einzelne Wiederholungseinheit ist, sondern vielmehr eine Sequenz, die innerhalb eines Heptapeptid-Paares liegt (Stiller et al., 2004; Vojnic et al., 2006). Daher wurde eine Auswahl von Di-Heptapeptiden mit verschiedenem Modifikationsmuster verwendet (Abb. 3).



## Ergebnisse

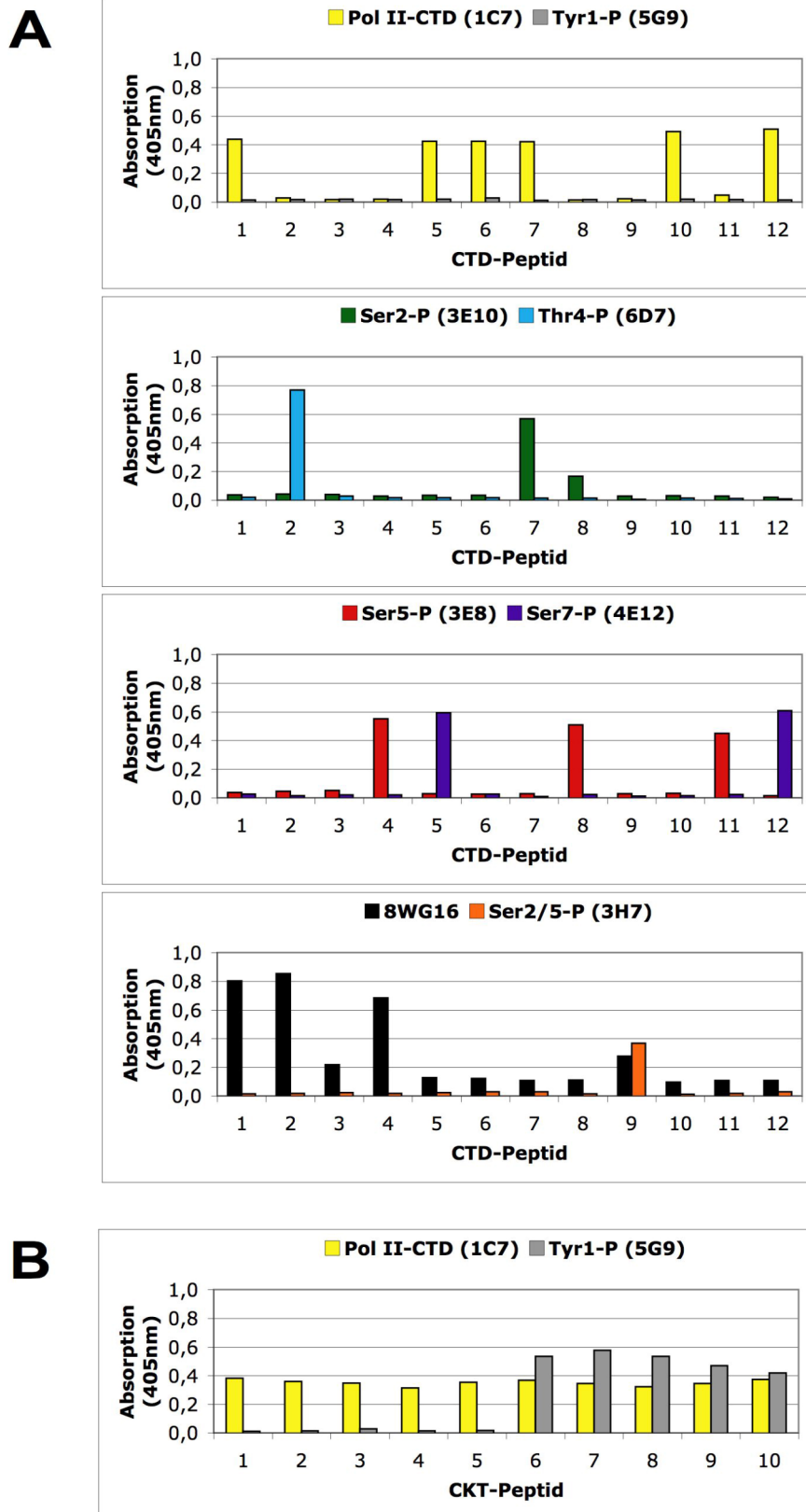
Peptidname	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Modifizierte Aminosäure
CTD-1	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	-
CTD-2	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Thr-4-P
CTD-3	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Thr-4-P, Ser-5-P
CTD-4	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Ser-5-P
CTD-5	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Ser-7-P
CTD-6	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Tyr-1-P
CTD-7	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Ser-2-P
CTD-8	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Ser-5-P, Ser-2-P
CTD-9	S	P	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	C	Ser-2-P, Ser-5-P
CTD-10	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Tyr-1-P, Ser-2-P
CTD-11	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Ser-5-P, Ser-7-P
CTD-12	Y	S	P	T	S	P	S	Y	S	P	T	S	P	S	C	Ser-7-P, Ser-2-P

CKT-1	Y	S	P	T	S	P	K	Y	S	P	T	S	P	S	C	-
CKT-2	Y	S	P	T	S	P	K-me1	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-me1
CKT-3	Y	S	P	T	S	P	K-me2	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-me2
CKT-4	Y	S	P	T	S	P	K-me3	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-me3
CKT-5	Y	S	P	T	S	P	K-ac	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-ac
CKT-6	Y	S	P	T	S	P	K	Y	S	P	T	S	P	S	C	Tyr-1-P
CKT-7	Y	S	P	T	S	P	K-me1	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-me1, Tyr-1-P
CKT-8	Y	S	P	T	S	P	K-me2	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-me2, Tyr-1-P
CKT-9	Y	S	P	T	S	P	K-me3	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-me3, Tyr-1-P
CKT-10	Y	S	P	T	S	P	K-ac	Y	S	P	T	S	P	S	C	Lys7-ac, Tyr-1-P

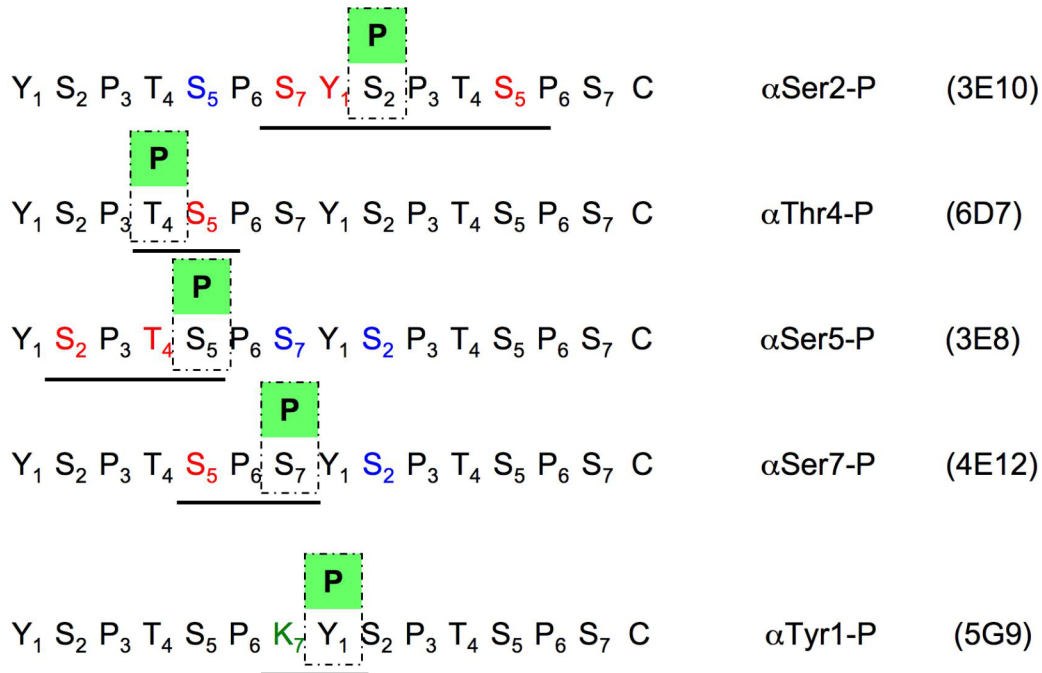
**Abb. 3. Aminosäuresequenzen der verwendeten CTD- bzw. CKT-Peptide.** Phosphorylierungsstellen sind magenta, Methylierungs- sowie Acetylierungsstellen sind gelb eingefärbt.

In Massenspektrometrie-Analysen wurden Tyrosin-1-Phosphorylierungen innerhalb der CTD bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit einem vorausgehenden Lysin an Position 7 einer Nicht-Konsensus-Wiederholung beschrieben (Villén et al., 2007; Dephoure et al., 2008). Daher wurden ebenfalls Di-Heptapeptide synthetisiert, die anstelle von Serin-7 ein Lysin mit verschiedenen Modifikationen trugen. Die nachfolgende Analyse der gewonnenen monoklonalen CTD-Antikörper zeigte, dass diese zwar hochspezifisch für die jeweilige Phosphorylierungsstelle waren (Abb. 4A), dass ihr Erkennungsprofil aber von den Modifikationen der benachbarten Aminosäuren limitiert wurde (Abb. 5). So wird z.B. der Phosphothreonin-4-Antikörper (Klon 6D7) von einem nachfolgenden Phosphoserin-5 behindert, umgekehrt ebenso der Phosphoserin-5-Antikörper von einem phosphorylierten Threonin-4 (Abb. 5). Tatsächlich war es zudem nicht möglich, einen *in vivo*-tauglichen Phosphotyrosin-1-Antikörper gegen ein Konsensus-Motiv zu generieren. Deswegen wurde bei allen folgenden Experimenten der Antikörper 5G9 verwendet, der gegen Peptide mit einem Lysin an Position 7 hergestellt wurde (Abb. 4B).



**Abb. 4. Charakterisierung der CTD-Antikörper.** Spezifität und Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegen modifizierte Peptide mit 2 Konsensus-Wiederholungen (A) bzw. Peptide mit einer Abweichung von der Konsensus-Sequenz an Position 7 (B) anhand von ELISA-Experimenten.

Bereits hier deutet sich die Komplexität und Schwierigkeit an, die in die Interpretation der folgenden Ergebnisse einfließen muss. Denn ein negatives Resultat muss mitnichten bedeuten, dass eine bestimmte (Kombination von) Phosphorylierung nicht vorhanden ist, sondern es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass sich ein Hindernis im Erkennungsmotiv des jeweiligen Antikörpers befinden könnte.



**Abb. 5. Überblick über die Erkennungsmotive der monoklonalen Antikörper innerhalb einer CTD-Wiederholung (schwarz unterstrichen).** Modifikationen an Aminosäureresten in roter Schrift hemmen die Antikörperbindung, Modifikationen an Aminosäureresten in blauer Schrift beeinträchtigen die Bindung nicht. Für die Reaktivität von 5G9 ist ein Lysin an Position 7 (in grün) unabdingbar. Es wurden nicht alle möglichen Kombinationen getestet.

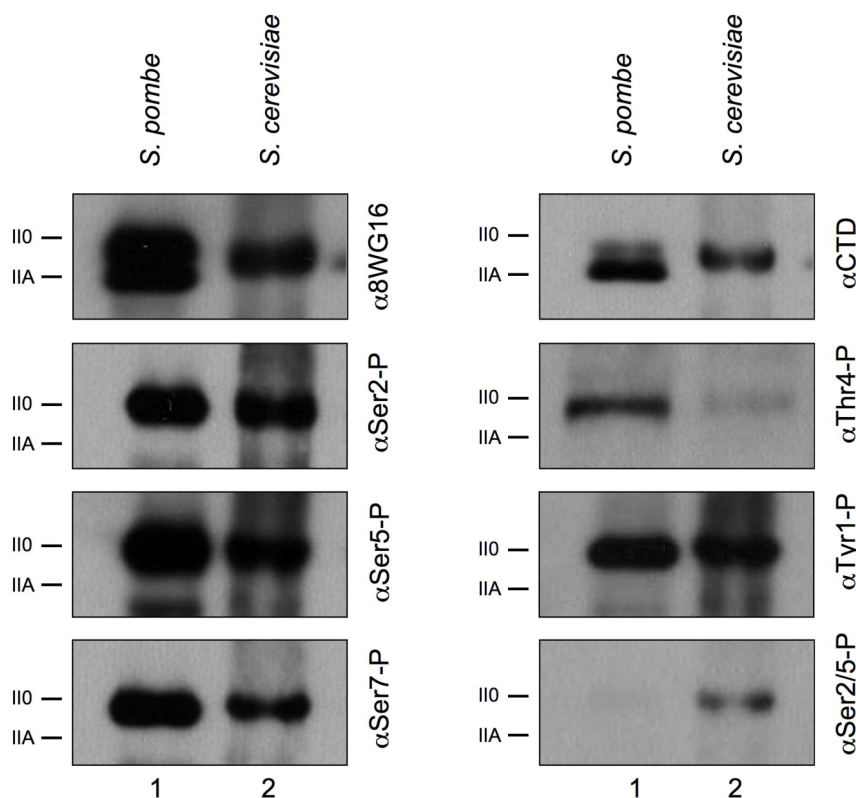
### 3.1.1 Der CTD-Phosphorylierungsstatus, von der Hefe bis zum Menschen

Der nächste Schritt war natürlich, die Antikörper nach ihrer Charakterisierung *in vitro* nun *in vivo* zu testen und damit die Existenz der neuen CTD-Modifikationen, wie die Threonin-4- und Serin-7-Phosphorylierung zu bestätigen, sowie um die allgemeine Tauglichkeit der generierten Werkzeuge zu wissenschaftlichen Zwecken unter Beweis zu stellen. Hierzu wurden zunächst Gesamtzell-Extrakte der beiden Modellorganismen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* in

## Ergebnisse

der Western-Analyse auf die verschiedenen CTD-Modifikationen hin untersucht (Abb. 6). Als Kontrolle wurde der Antikörper 8WG16 mitgeführt, der die CTD unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennt.

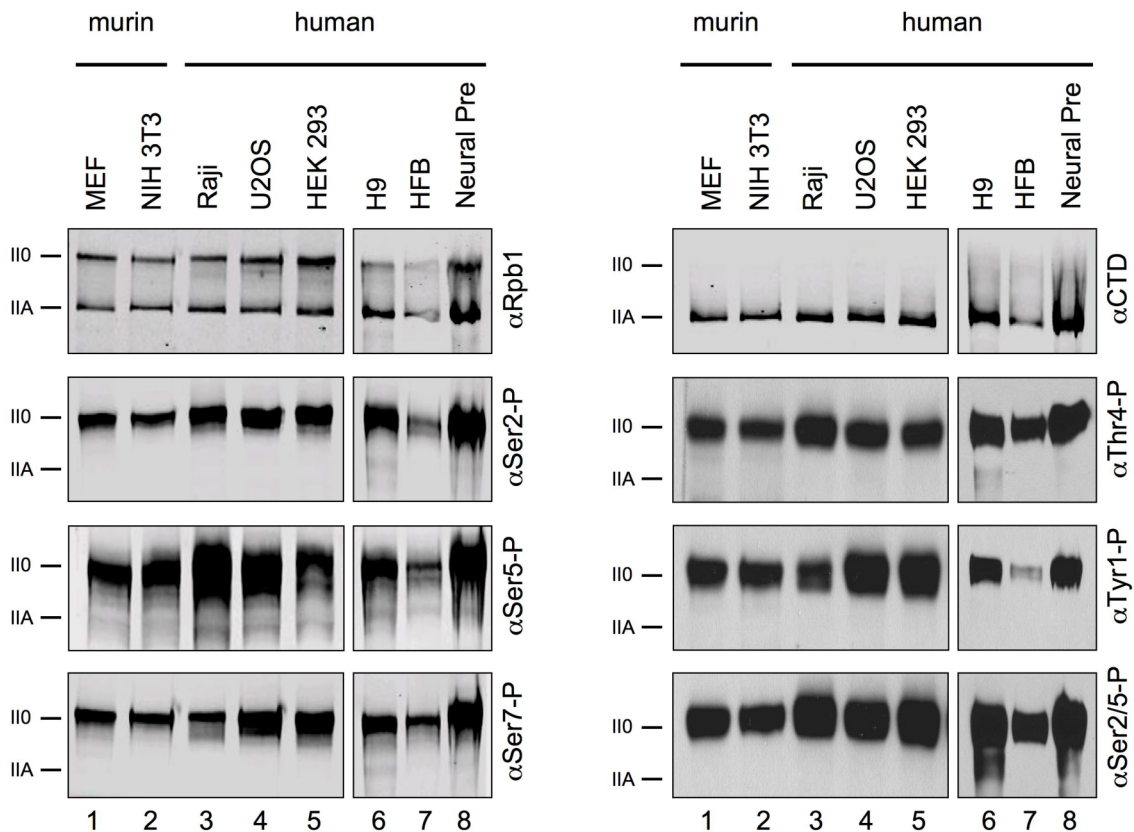
Die gewonnenen Daten zeigen eindeutig, dass der Großteil der möglichen Phosphorylierungen in beiden Organismen vorkommt, allein jeweils ein Antikörper zeigt keine detektierbare Aktivität ( $\alpha$ Thr4-P in *S. cerevisiae*;  $\alpha$ Ser2/5-P in *S. pombe*). Obwohl beide Hefen fast das vollständige Repertoire an CTD-Phosphorylierungen tragen, zeigt im SDS-Gel nur die große Untereinheit der Polymerase II von *S. pombe* die aus Säugetieren bekannten Formen Pol II<sub>0</sub> (hyperphosphoryliert, langsamer in SDS-PAGE) und Pol II<sub>A</sub> (hypophosphoryliert, schneller in SDS-PAGE), während diese beiden Polymerase-Populationen bei *S. cerevisiae* kaum aufzutrennen sind (Abb. 4 oben,  $\alpha$ 8WG16,  $\alpha$ CTD).



**Abb. 6. Reaktivität der CTD-Antikörper *in vivo*.** Gesamtzell-Lysate von Spalt- bzw. Bäckerhefe wurden mittels Western-Blot nach SDS-PAGE auf ihre CTD-Modifikationen untersucht. Die Markierungen kennzeichnen die schneller laufende Pol II<sub>A</sub>-Form (hypophosphoryliert) sowie die langsamer laufende Pol II<sub>0</sub>-Form (hyperphosphoryliert).

Dies kann als erster Hinweis gelten, dass nicht allein die CTD-Phosphorylierungen den Unterschied zwischen besagten Populationen ausmachen, sondern dass noch

andere CTD-Modifikationen wie z.B. die Glykosylierung der Serine/Threonine und/oder die *cis/trans*-Isomerisierung der Proline vorhanden sein könnten.



**Abb. 7. CTD-Modifikationen in Säugetierzellen.** Reaktivität der monoklonalen CTD-Antikörper gegen Lysate verschiedener Säugetier-Zelllinien in der Western-Analyse nach SDS-PAGE. Die Markierungen kennzeichnen die schneller laufende Pol IIA-Form sowie die langsamer laufende Pol IIO-Form. Die verschiedenen CTD-Phosphorylierungen befinden sich alle in den Polymerasen der Pol IIO-Population.

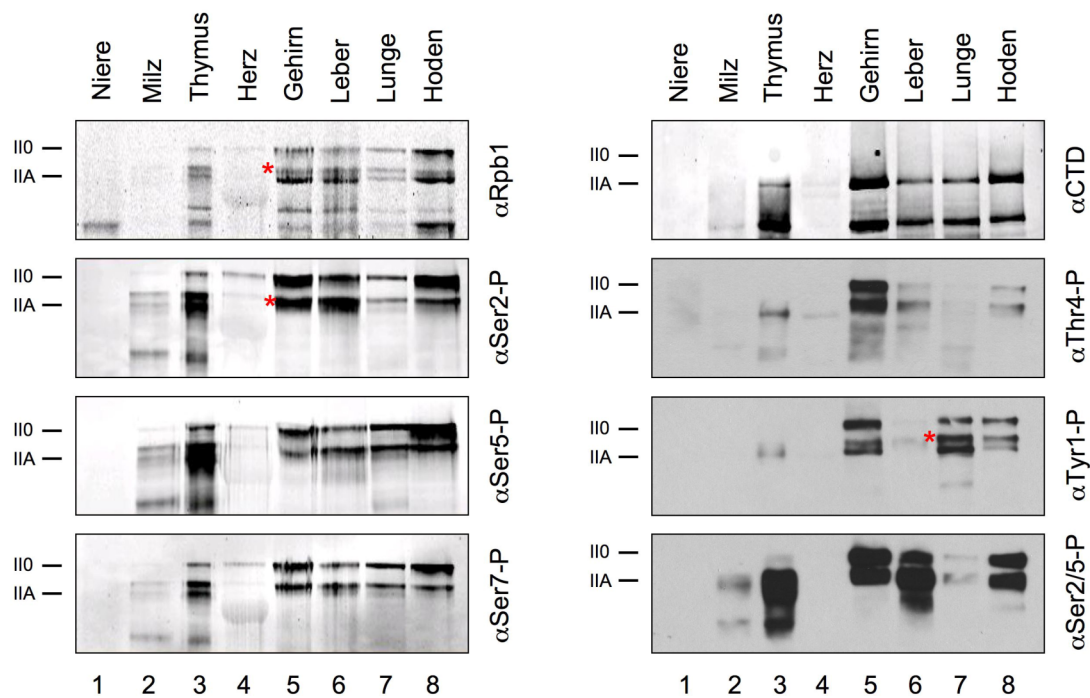
In gleichem Maße wie die Hefen, wurden auch verschiedene Zelllinien höherer Organismen auf ihr CTD-Modifikationsmuster und etwaige Unterschiede untersucht. Analysiert wurden Gesamtzell-Extrakte zweier embryonaler Mausfibroblastenlinien, MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) und NIH 3T3. Desweiteren wurden Gesamtzell-Extrakte von verschiedenen humanen Zelllinien mit unterschiedlichem Hintergrund untersucht. Hier wurde eine Auswahl an Krebszelllinien und primärer Zellen analysiert: Bei der Linie Raji handelt es sich um Burkitt's Lymphoma-Zellen, bei U2OS um eine Osteosarcoma-Zelllinie. Die etablierte Zelllinie HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293 entstammt ursprünglich einer embryonalen Niere, H9 ist eine weibliche embryonale Stammzelllinie. HFB-Zellen sind primäre Hautfibroblasten die aus der Vorhaut Neugeborener gewonnen wurden, und bei *Neural Precursor*-Zellen

handelt es sich um eine Mischkultur aus neuronalen Vorläufern und Neuronen, die sich per gesteuerter Differenzierung aus embryonalen Stammzellen entwickelt haben. Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, dass die verschiedenen Zelllinien bei und ab 3 Tage vor der Ernte eine vergleichbare Dichte hatten. Als Kontrolle wurde hier der Pol-3-3-Antikörper ( $\alpha$ Rpb1) verwendet, der die große Untereinheit der RNA Polymerase II außerhalb der CTD pro Molekül genau einmal erkennt.

Der Abstand zwischen der Pol II<sub>0</sub>- und Pol II<sub>A</sub>-Form ist im SDS-Gel im Vergleich zu *S. pombe* noch deutlicher zu erkennen, jedoch werden auch schwache Banden sichtbar, die ein Schmier zwischen den prominenten Banden beider Formen bilden (Abb. 7). Die Daten zeigen deutlich, dass alle analysierten CTD-Modifikationen in sämtlichen untersuchten Gesamtzell-Extrakten auftreten und dabei ausnahmslos die Pol II<sub>0</sub>-Form anfärbten. Während der Phosphoserin-2-Antikörper relativ scharfe Banden detektierte und hauptsächlich eine Reaktivität gegenüber der Pol II<sub>0</sub>-Bande aufwies, detektierten die anderen CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper auch Polymerasen die unterhalb dieser Bande liefen. Einen deutlichen Unterschied in ihrem Phosphorylierungsgrad zu den übrigen getesteten Zelllinien zeigten allein die Lysate der HFB-Zellen (erkennbar v.a. bei  $\alpha$ Ser2-P,  $\alpha$ Ser5-P und  $\alpha$ Tyr1-P). Die anderen Zelllinien ergaben ein nahezu identisches Muster, was wiederum verdeutlicht, dass der Durchschnitt aller Polymerasen einer Zelle gleichsam phosphoryliert sein mag, die möglichen Unterschiede einzelner Moleküle können durch diese Methode jedoch nicht aufgelöst werden. Hierzu müssen in der Zukunft andere Methoden entwickelt werden um wirklich Klarheit über die Kombinatorik an CTD-Modifikationen bestimmter Populationen von RNA-Polymerasen und deren spezieller Funktion in der Genexpression einer Zelle zu schaffen.

### **3.1.2 Das CTD-Modifikationsmuster in murinen Geweben**

Um einen weiteren Schritt weg von der teilweise doch recht artifiziellen Forschung an kultivierten Zelllinien, hin zur echten *in vivo* Forschung zu machen, wurden zu guter Letzt verschiedene Gewebe-Extrakte, die aus Mäusen gewonnen wurden, analysiert (Abb. 8). Da die klassischen Ladungskontrollen, wie Strukturproteine, beispielsweise  $\alpha$ -Tubulin, in den verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden, wurde Gesamtkonzentration an Proteinen gemessen und der Gelbeladung zugrunde gelegt.



**Abb. 8. Gewebe-spezifische CTD-Modifikationen.** Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegen murine Gewebe-Proben in der Western-Analyse nach SDS-PAGE. Die schneller laufende Pol IIA-Form sowie die langsamer laufende Pol II0-Form sind gekennzeichnet, ebenso wie eine zusätzliche hyperphosphorylierte Bande (\*), die in sämtlichen Geweben auftaucht.

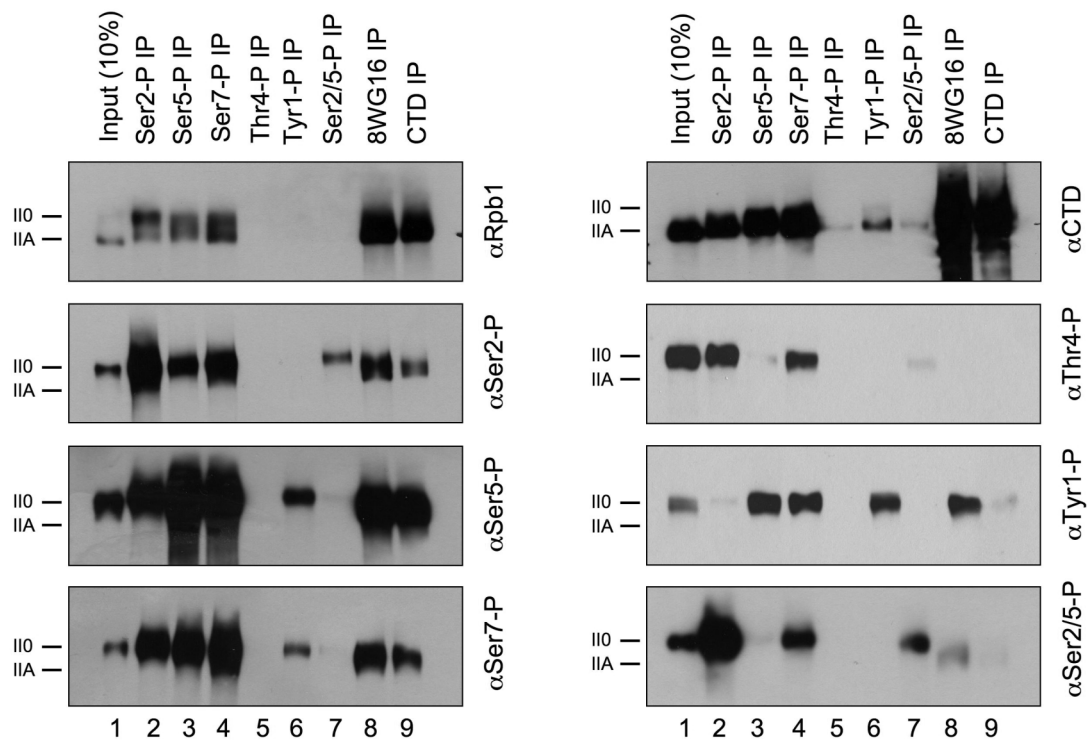
In sämtlichen Mausgeweben (es wurden 10 individuelle Mäuse analysiert) findet sich, im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungen in der Zellkultur, ein abweichendes Muster an CTD-Modifikationen bzw. Polymerase-Populationen. So erscheint im SDS-Gel eine dritte Bande knapp über der IIA-Form (Abb. 8, Stern-Markierung), die zum einen sämtliche Phosphorylierungen trägt und sich zum anderen bezüglich der Signalintensität der Phosphoantikörper kaum von der Pol II0-Form unterscheidet (diese Form der Polymerase ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden und wird fortan in dieser Arbeit Pol IIX genannt werden). Dies lässt mehrere Rückschlüsse zu. Erstens tragen die Phosphorylierungen vielleicht direkt zu einem Shift im SDS-Gel bei (Vergleich IIA zu IIX), der gewaltige Abstand zwischen Pol IIA und Pol II0 ist jedoch allein mit dem Phosphorylierungsstatus nicht zu erklären (Vergleich IIX zu II0). Hier müssen entweder zusätzliche CTD-Modifikationen oder eine Veränderung in der Konformation eine Rolle spielen, die aber natürlich auch durch die Kombinationen von Phosphorylierungen vermittelt

werden könnten. Interessanterweise weichen die Verhältnisse der Phosphorylierungs-Signalintensitäten in den unterschiedlichen Organen merklich voneinander ab. Hier sind bis zu 3 verschiedene Muster auszumachen: 1. Hyperphosphorylierte I10- und IIX-Form mit hypophosphorylierter IIA-Form (Gehirn, Leber, Lunge, Hoden). 2. Hyperphosphorylierte IIX- und IIA-Form (Milz, Thymus, besonders deutlich bei  $\alpha$ Ser2-P und  $\alpha$ Ser5-P) und 3. die alleinige hyperphosphorylierte I10-Form (Herz, erkennbar bei  $\alpha$ Ser2-P und  $\alpha$ Ser7-P). Vergleicht man nun nicht die verschiedenen Organe, sondern einzelne CTD-Modifikationen in diesen Geweben untereinander, treten ebenfalls unübersehbare Unterschiede zutage. So zeigt der Phosphotyrosin-1-Antikörper kaum Reaktivität im Lebergewebe, aber besonders starke Signale in der Lunge. Die Reaktivitäten der Phosphoserin-2- und Phosphoserin-2/Phosphoserin-5-Antikörper verhalten sich hierzu jedoch komplett gegensätzlich. Dies könnte einerseits darin begründet liegen, dass ein Phosphat an Serin-2 die Bindung des Phosphotyrosin-1-Antikörpers stört (Abb. 5). Andererseits sollte, wenn diese Erklärung zuträfe, das Muster identisch sein, da man sonst eine gewisse Willkür des Substrats voraussetzen müsste, da einmal die Bindung von  $\alpha$ Tyr1-P (Lunge) bevorzugt werden würde, und einmal die von  $\alpha$ Ser2/5-P (Leber). Des Weiteren müssten sich die konkurrierenden Phosphorylierungen ausschließlich in den identischen Wiederholungseinheiten befinden, was hinsichtlich der 52 CTD-Wiederholungen einer Säugetier-Polymerase eher unwahrscheinlich sein dürfte. Die weitaus interessantere Variante wäre natürlich der Zusammenhang vom CTD-Phosphorylierungsstatus und dem allgemeinen Expressionslevels der verschiedenen Gewebe.

### 3.1.3 Die Kombinationen der CTD-Phosphorylierungen

Um die Kombinatorik an CTD-Modifikationen weiter zu untersuchen, wurden sogenannte Tandem-Immünpräzipitationen (IP) durchgeführt. Hierzu wurden mithilfe der verschiedenen monoklonalen CTD-Antikörper Immünpräzipitationen aus Gesamtzell-Extrakten von Raji-Zellen durchgeführt und diese wiederum in der Western-Analyse auf die unterschiedlichen CTD-Modifikationen hin untersucht (Abb. 9).





**Abb. 9. Tandem-IPs.** Untersuchung der Kombinationsmöglichkeiten an CTD-Modifikationen mittels Western-Analyse nach Immunpräzipitation.

Obwohl sich, bis auf eine Ausnahme ( $\alpha$ Thr4-P), alle Antikörper für die IP eignen und für die jeweils eigene IP positive Signale im Western-Analyse zeigten, erschienen in der Immun-Detektion der großen Untereinheit Rpb1 kaum Signale für Phosphotyrosin-1- und die Phosphoserin-2/5-IP (Abb. 9, Spur 8 und 9). Dies könnte bedeuten, dass nur wenige Polymerase-Moleküle von diesen Antikörpern präzipitiert werden konnten, diese wenigen jedoch die jeweiligen Modifikationen in vielen ihrer CTD-Wiederholungen trugen. Zudem gilt weiterhin, dass einige Reaktivitäten von Antikörpern sich komplett ausschließen. So scheinen fast alle Ser5-phosphorylierten Polymerasen keinerlei Threonin-4-Phosphorylierung zu tragen, unabhängig ob innerhalb derselben oder in unterschiedlichen CTD-Wiederholungseinheiten der gleichen Polymerase. Gleiches gilt für Serin-2-phosphorylierte Polymerasen bezüglich  $\alpha$ Tyr1-P, auch hier findet man keinerlei Überschneidungen. Legt man also diese Daten zugrunde, befinden sich im Pool aller Polymerasen einer Zelle hauptsächlich homogen-CTD-modifizierte Moleküle, da eine Polymerase deren CTD-Wiederholungen teilweise die eine, teilweise die andere Modifikation trüge, von

beiden Antikörpern präzipitiert und auch in der Immun-Detektion erkannt werden müsste.

### **3.2 Veränderungen im Phosphorylierungsmuster der CTD**

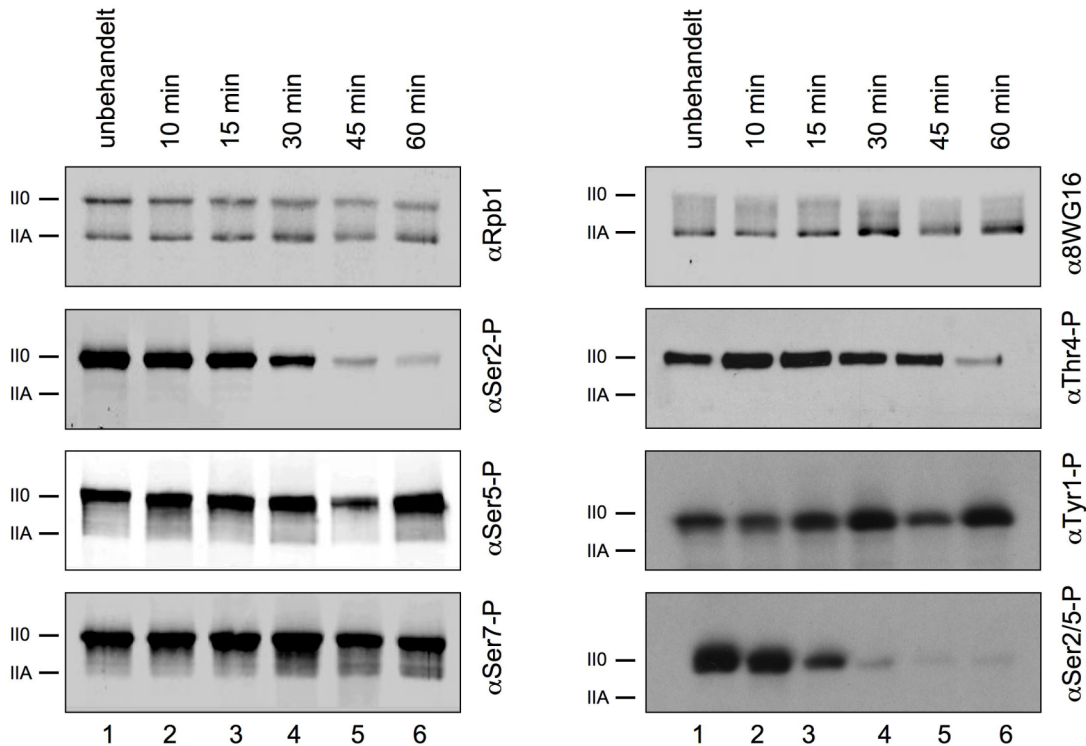
Die reversible Modifikation der carboxy-terminalen Domäne von Pol II spielt eine Schlüsselrolle in der allgemeinen Genexpression von eukaryotischen Zellen. Bereits seit vielen Jahren ist zudem bekannt, dass Stresse wie z.B. Hitzeschock oder Hyperosmolarität zu deutlichen Veränderungen in der CTD-Phosphorylierung sowie der Expression zahlreicher Gene führt (Venetianer et al., 1995). Kinasen und Phosphatasen sorgen so im Wechselspiel für die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände der CTD (Dubois et al., 1999). Die Untersuchungen der Forschungsgruppen um Olivier Bensaude und Michael Dahmus (Bonnet et al., 1999) zeigten zudem, dass diese Art von zellulärem Stress zu der Ausbildung einer neuen Population an phosphorylierter RNA-Polymerase II (Pol IIM-Form) führt, die im SDS-Gel ebenfalls knapp unterhalb der IIO-Bande läuft, nicht an Chromatin gebunden vorkommt und die nicht von einer Hemmung der Transkription betroffen ist. Als wahrscheinliche, verantwortliche Kinasen für dieses Phänomen wurden die MAP-Kinasen (*Mitogen Activated Protein Kinases*) ERK 1/2 identifiziert. Obwohl sich das Laufverhalten der beiden Formen unterscheidet, könnte diese Pol II-Form auch einen Hinweis auf die, in den murinen Geweben identifizierte, Pol IIX-Form geben. Um eine Idee zu erhalten, welche Enzyme an der Modifikation der neuentdeckten CTD-Phosphorylierungen an Tyrosin-1, Threonin-4 und Serin-7 beteiligt sind und welche Funktion besagten Modifikationen zugrunde liegen könnte, wurden NIH 3T3-Zellen verschiedenen Stress-Situationen ausgesetzt und ihr Phosphorylierungsstatus daraufhin mittels Western-Analyse untersucht.

#### **3.2.1 Der Phosphorylierungsstatus der Pol II CTD in hitzegeschockten Zellen**

Vorangegangene Studien zeigten, dass Phosphorylierung der Pol II-CTD während eines Hitzeschocks zunimmt (Dubois et al., 1994; Legagneux et al., 1990). Um den Einfluss eines Hitzeschocks auf den Phosphorylierungsgrad der CTD v.a. unter Berücksichtigung der neuentdeckten Modifikationen genauer zu untersuchen wurden murine Fibroblasten (NIH 3T3) für bis zu 60min bei 45°C im Wasserbad inkubiert und

## Ergebnisse

anschließend einer Western-Analyse mit den monoklonalen CTD-Antikörpern unterzogen.



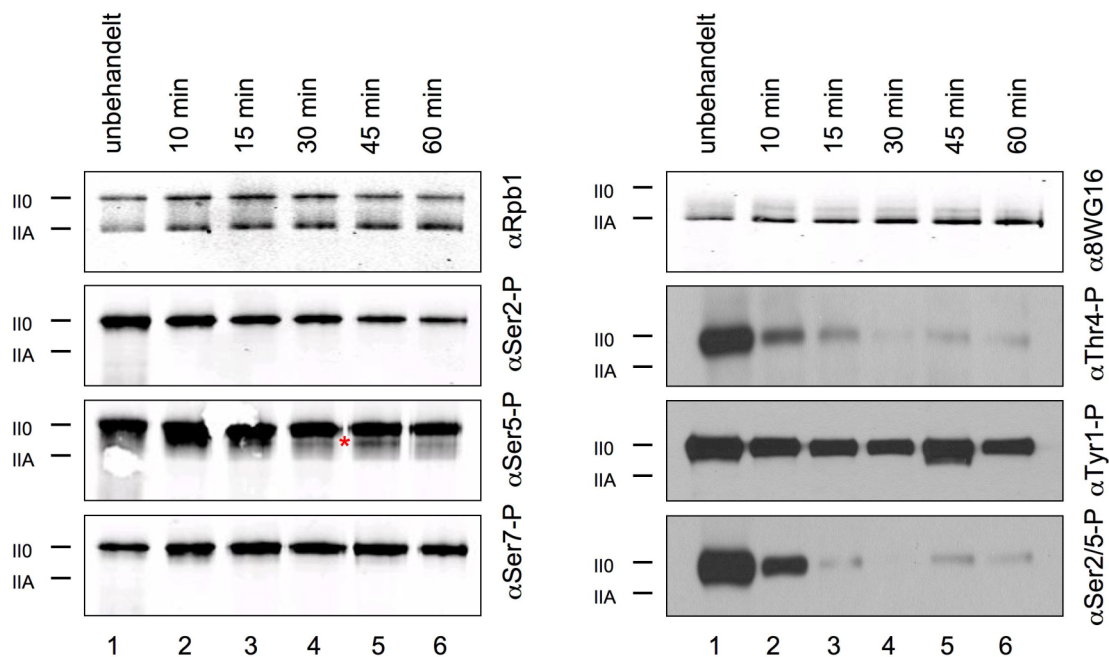
**Abb. 10. Veränderung des Modifikationsmusters nach zellulärem Stress.** Western-Analyse der CTD-Modifikationen in NIH 3T3-Zellen nach Hitzeschock (45°C). Die Reaktivitäten von  $\alpha$ Ser2-P,  $\alpha$ Ser2/5-P und  $\alpha$ Thr4-P nahmen mit zunehmender Dauer der Hitzebehandlung deutlich ab.

Überraschenderweise zeigte sich hier das genaue Gegenteil von dem in der Literatur beschriebenen Phänomen. So nimmt weder die hyperphosphorylierte Pol II0-Form noch eine der Phosphorylierungen sichtbar zu, noch reduziert sich die hypophosphorylierte Pol IIA-Form (Abb. 10, oben). Im krassen Gegensatz dazu nimmt sowohl die Reaktivität von  $\alpha$ Thr4-P, als auch die von  $\alpha$ Ser2-P und in logischer Konsequenz von  $\alpha$ Ser2/5-P ab (Abb. 10). Da gleichzeitig weder die Phosphorylierung an Serin-5, noch an Tyrosin-1 merklich zunehmen, kann eine Hemmung der Antikörperbindung durch störende Modifikationen im Erkennungsepitop sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Tatsächlich könnte eine Aktivierung bestimmter Phosphatasen dazu führen, die CTD-Phosphorylierung und damit die korrekte Expression der Mehrheit der Gene zu verringern, während die Transkription und Prozessierung Stress-spezifischer Gene unabhängig von Serin-2-

und Threonin-4-Phosphorylierung vonstatten gehen könnten. Die Frage, ob beide Phosphorylierungen direkte Ziele einer Phosphatase sind, oder ob die eine Phosphorylierung von der anderen abhängt und daher ein indirekter Effekt für die Abnahme der jeweils anderen Modifikation verantwortlich zeichnet, konnte bisher nicht geklärt werden.

### 3.2.2 Phosphoserin-2, das schwächste Glied in der Kette?

Vorangegangene Studien zeigten, dass, neben der Hitzeschock-Behandlung, auch weitere Stress-Situationen zu einer Veränderung des CTD-Phosphorylierungsmusters einer Zelle führen können. So wurde beschrieben, dass in Zellen, die einem osmotischen Schock ausgesetzt waren, die Kinasen ERK 1/2 aktiviert werden (Matsuda et al., 1995).



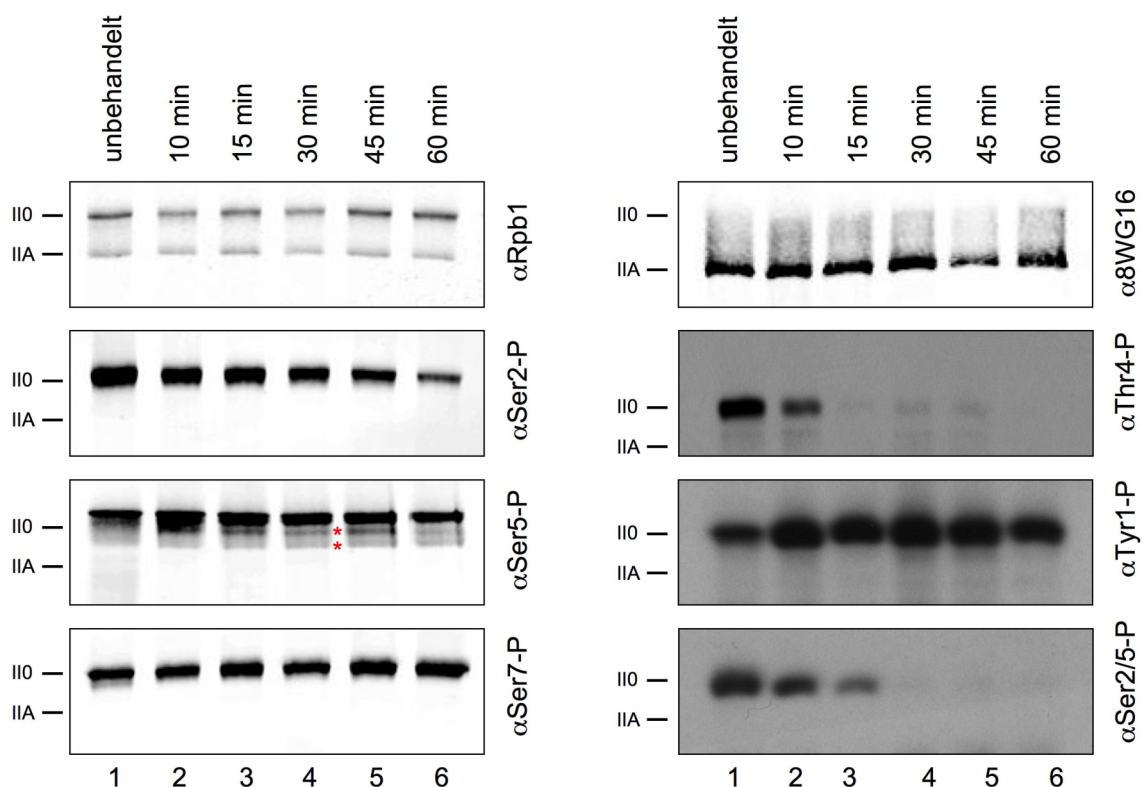
**Abb. 11. Western-Analyse der CTD-Modifikationen in NIH 3T3-Zellen nach osmotischen Stress (300mM Sorbitol).** Die Reaktivitäten von  $\alpha$ Ser2-P,  $\alpha$ Ser2/5-P und  $\alpha$ Thr4-P nahmen mit zunehmender Dauer deutlich ab. Gleichzeitig erschien eine neue, Phosphoserin-5-reaktive Bande (\*).

Um die CTD-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen zu untersuchen wurden Gesamtzell-Lysate von murinen Fibroblasten (NIH 3T3) hergestellt, die unterschiedliche Zeitspannen in Sorbitol (300mM)-haltigem Medium inkubiert wurden (Abb. 11). Daraufhin wurden sämtliche CTD-Modifikationen mittels Western-

## Ergebnisse

Analyse abgefragt. Die Ergebnisse spiegelten die Resultate der Hitzeschock-Kinetiken nahezu identisch wider. Während die Pol II<sub>0</sub>-Form, genau wie die Tyrosin-1-, Serin-5- und Serin-7-Phosphorylierung, stabil blieb, nahmen Threonin-4- und Serin-2-Phosphorylierung innerhalb weniger Minuten rapide ab. Das Auftreten einer Pol IIM-Form konnte trotz mehrfacher Wiederholung des Experimentes nicht eindeutig bestätigt werden, wobei sich eine Phosphoserin-5-reaktive Bande identifizieren ließ (Abb. 11,  $\alpha$ Ser5-P [\*]), die dieser Bande entsprechen könnte.

Um die bisherigen Beobachtungen zu bestätigen, wurde eine weitere Zeitkinetik mit gestressten Zellen durchgeführt. Hierzu wurden NIH 3T3-Zellen mit 1mM Wasserstoff-Peroxid inkubiert und nach bestimmten Zeitpunkten Gesamtzell-Lysate hergestellt, die in der Western-Analyse auf die verschiedenen CTD-Modifikationen hin analysiert wurden (Abb. 12).



**Abb. 12. Western-Analyse der CTD-Modifikationen in NIH 3T3-Zellen nach oxidativen Stress (1mM Wasserstoff-Peroxid).** Die Reaktivitäten von  $\alpha$ Ser2-P,  $\alpha$ Ser2/5-P und  $\alpha$ Thr4-P nahmen mit zunehmender Dauer der Behandlung deutlich ab. Gleichzeitig erschienen zwei neue, Phosphoserin-5-reaktive Banden (\*).

Wie bei beiden vorangegangenen Versuchsreihen, stellten sich die Serin-2- (siehe v.a.  $\alpha$ Ser2/5-P) und Threonin-4-Phosphorylierung als sehr labile Modifikationen heraus, die innerhalb kürzester Zeit drastisch abnahmen, während die anderen Phosphorylierungen, genau wie die Pol II0-Form keinerlei erkennbaren Schwankungen aufwiesen. In der Phosphoserin-5-reaktiven Schmier unterhalb der prominenten Serin-5-Phosphorylierungsbande waren in den gestressten Zellen zudem diesmal sogar zwei zusätzliche Banden (\*) zu detektieren, von denen die obere der vorher beschriebenen Pol IIM-Form entsprechen könnte. In der mitgeführten Kontrolle wurde außerdem gut sichtbar, dass eine ganze Bandbreite an Polymerasen mit unterschiedlichem Laufverhalten zwischen den beiden hervorstechenden Pol II0- und IIA-Banden vorhanden sind (Abb. 12,  $\alpha$ 8WG16).

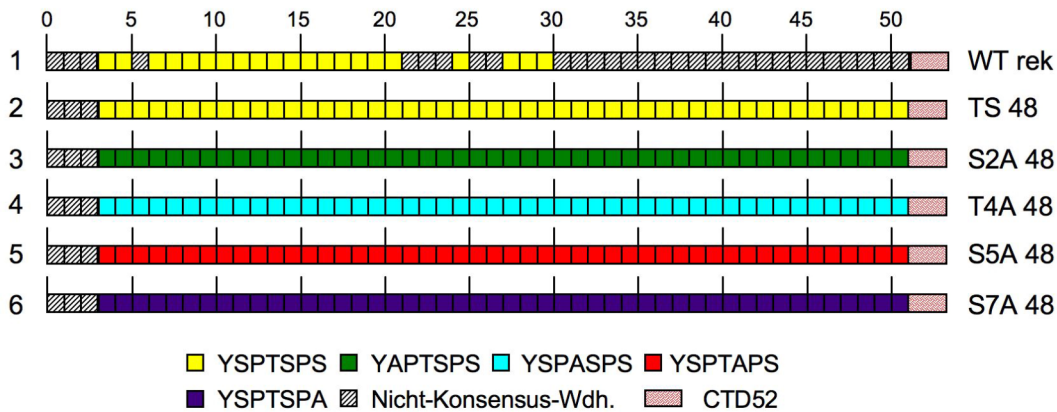
Einerseits förderten die durchgeführten Kinetiken interessante Aspekte wie die Labilität der Serin-2-Phosphorylierung zu Tage, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription einer Zelle während verschiedener Stressbedingungen darstellen könnte. Andererseits blieben die ursprünglichen Fragen nach Hinweisen auf die verantwortlichen Kinasen und etwaige Funktionen der neuentdeckten Modifikationen in den stress-induzierten Signalwegen unbeantwortet, da keine Zunahme einer bestimmten Phosphorylierung stattfand nachdem die Zellen dem jeweilige Stress ausgesetzt worden waren. Scheinbar teilt sich aber die hyperphosphorylierte Population der II0-Form in mehrere Populationen mit unterschiedlichem Phosphorylierungsstatus auf, sobald die Zelle unter Stress gerät.

### **3.2 Die Bedeutung der CTD-Konsensus-Wiederholungseinheiten**

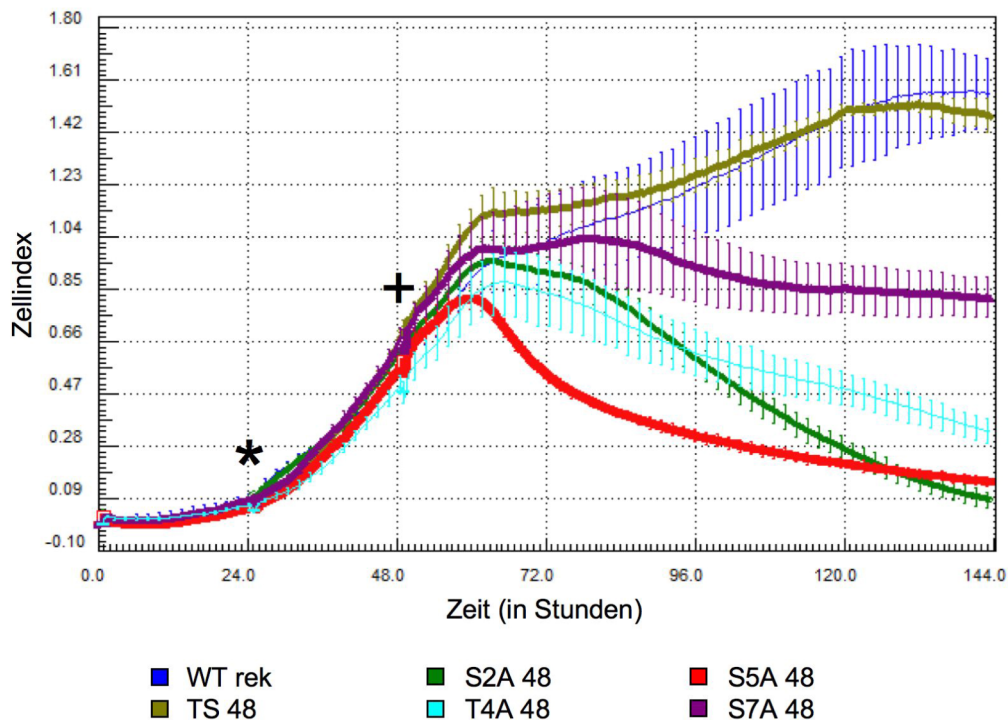
Um die Rolle der Struktur der CTD-Wiederholungseinheiten und ihrer Phosphorylierungen weiter zu erkunden, wurde auf ein System zurückgegriffen, das den Vergleich von CTDs mit unterschiedlicher Länge und verschiedener Zusammenstellung der Aminosäuren ihrer Wiederholungseinheiten *in vivo* erlaubt. Hierbei handelte es sich rekombinante RNA-Polymerasen die eine Punktmutation enthalten (Asn793Asp), die eine Resistenz gegen  $\alpha$ -Amanitin, das Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, vermittelt (Bartolomei and Corden, 1995). So führt die Zugabe von  $\alpha$ -Amanitin zur Hemmung und zum Abbau der endogenen RNA-Polymerase II ohne die Aktivität der rekombinanten Polymerase zu beeinträchtigen (Meininghaus et al., 2000).

3.3.1 Der Einfluss der Konsensus-Sequenz auf die CTD-Phosphorylierung

**A**



**B**

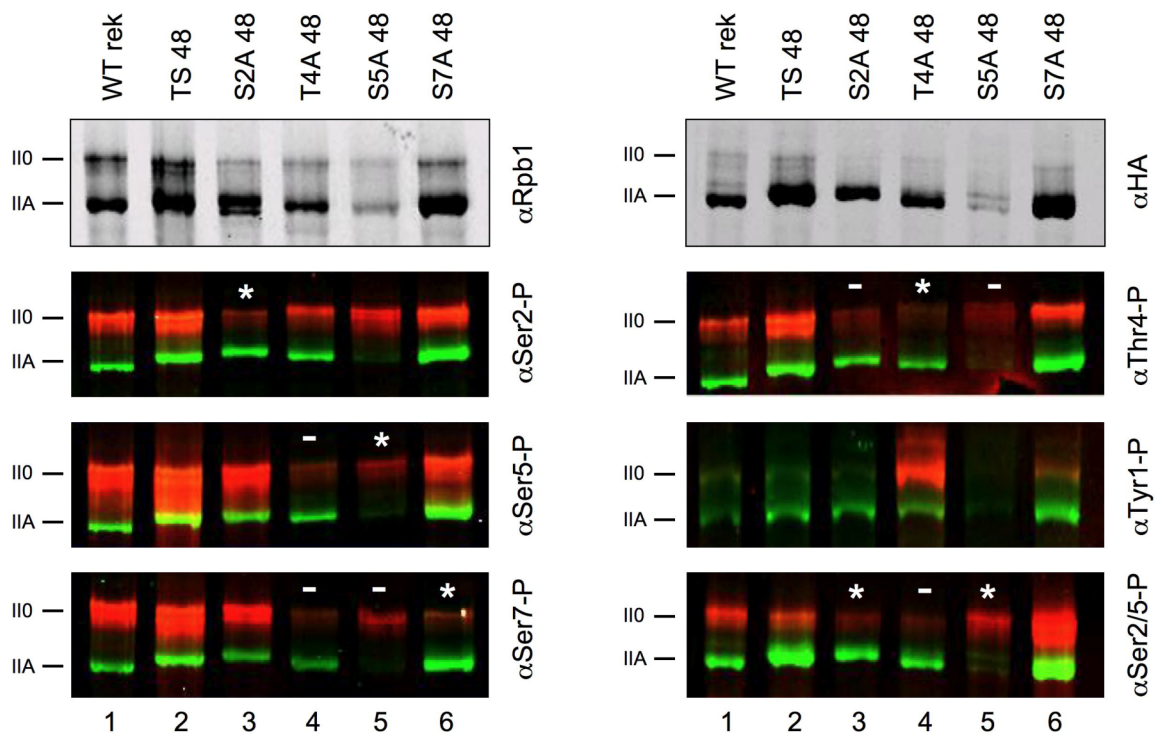


**Abb. 13. Untersuchung der Bedeutung der Konsensus-Sequenz.** (A) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der verschiedenen synthetischen CTD-Austausch-Mutanten. Die jeweils mutierte Position ist in allen CTD-Wiederholungen, außer Wiederholungseinheiten 1 bis 3, sowie 52 (Nicht-Konsensus-Wiederholungen, die für die Stabilität der CTD essenziell sind) ausgetauscht. (B) Proliferations-Assay von HEK 293 Zellen während und nach transients Transfektion mit den synthetischen CTD-Mutanten (\*) und dem chemischen Knock-Out der endogenen Polymerase II durch  $\alpha$ -Amanitin (+).

Um die Funktion der einzelnen Phosphorylierungen und deren Einfluss untereinander weitergehend zu untersuchen wurden rekombinante Polymerasen mit Nicht-Konsensus-Wiederholungen mit der Wildtyp-Polymerase verglichen. In Abbildung 13A ist eine schematische Darstellung der CTDs der rekombinanten Polymerasen zu sehen: 1. Die rekombinante Wildtyp-Polymerase als Kontrolle (WT rek). 2. Eine Mutante mit ausschließlich Konsensus-Wiederholungen (TS 48) in der CTD, ausgenommen die ersten drei und die letzten Wiederholungseinheiten, da diese für die Stabilität der großen Untereinheit essenziell sind (Chapman et al., 2005). 3.-5. CTDs mit Austausch der einzelnen Phosphorylierungsstellen zu Alanin. Um die Auswirkungen dieser Aminosäure-Austausche auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden die Mutanten nach transients Transfektion mithilfe des xCELLigence-Systems auf ihre Proliferation hin untersucht (Heidemann, 2009). Dieses System erlaubte die Echtzeitanalyse der Zellteilung vor, während und nach der Transfektion bzw. dem Ausschalten der endogenen Polymerase durch  $\alpha$ -Amanitin. Dazu wurden HEK 293-Zellen 24 Stunden nach dem Ausplattieren auf eine 96-Loch-Platte mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert und weitere 24 Stunden danach mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt (Abb. 13B, Transfektion [\*],  $\alpha$ -Amanitin [+]). Die Zellproliferation wurde von Beginn des Experiments bis 5 Tage nach der Transfektion ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen mit der Ser5Ala-Mutation wenige Stunden nach dem Knockdown der endogenen Polymerase nicht nur die Proliferation einstellten, sondern gänzlich abstarben. Einen ähnlich dramatischen Effekt zeigten Zellen mit rekombinanten Polymerasen, bei denen Serin-2 oder Threonin-4 zu Alanin ausgetauscht waren. Die Ser7Ala-Mutanten starben zwar nicht so rapide, die Zellen stellten jedoch die Proliferation nahezu vollkommen ein. Interessanterweise wurde die Zellteilung von einer CTD, die ausschließlich aus Konsensus-Wiederholungen besteht nicht beeinflusst. Bei der TS 48-Mutante verlief die Wachstumskurve nahezu identisch zum rekombinanten Wildtyp. Zumindest in diesem Experiment erwiesen sich die Phosphorylierungsstellen und die Heptapeptidstruktur der CTD-Konsensus-Wiederholungen bezüglich der Viabilität der Zellen als essenziell. Die Absenz der Nicht-Konsensus-Wiederholungen, und damit deren potenzieller Modifikationen fielen dabei kaum ins Gewicht. Da einige der transfizierten Zellen, insbesondere die Ser5Ala- und Ser2Ala-Mutanten sehr schnell in den Zelltod gingen wurde für die nachfolgenden Experimente auf ein anderes Zellsystem zurückgegriffen. Um den Phosphorylierungsstatus der rekombinanten Polymerasen herauszufinden und



gleichzeitig zu gewährleisten, dass ausreichend Material für eine Analyse vorhanden sein würde, wurden Raji-Zelllinien verwendet, in denen sich die Polymerase-Konstrukte konditional exprimieren lassen (Meininghaus et al., 2000). Dies hatte den Vorteil, dass auch die lethalen Mutanten eingehend in der Western-Analyse charakterisiert werden konnten (Abb. 14). Dazu wurde 24h nach der Induktion  $\alpha$ -Amanitin ins Zellmedium gegeben und weitere 24h später die Gesamtzell-Lysate vorbereitet.



**Abb. 14. Phosphorylierung der CTD nach Manipulation der Konsensus-Sequenz.** Western-Analyse von Gesamtzell-Lysaten 48h nach Induktion der synthetischen CTD-Mutanten und 24h nach Zugabe von  $\alpha$ -Amanitin. Um die Expression der exogen-exprimierten,  $\alpha$ -Amanitin-resistenten Polymerase zu zeigen, wurden die Membranen sowohl mit Antikörper gegen die verschiedenen Modifikationen (rote Banden), als auch mit einem Antikörper gegen das HA-Tag (12CA5, grüne Banden) inkubiert. Die erwartete Abnahme der Reaktivität (\*), sowie Abweichungen bzw. Reduktion der Reaktivität durch die Mutation anderer Aminosäuren (-) sind gekennzeichnet.

Vergleicht man die Reaktivität des Antikörpers der die große Untereinheit, unabhängig ob exogen oder endogen, erkennt mit der des Antikörpers gegen die Hämagglutinin-Markierung der exogenen Polymerase, wird deutlich, dass die rekombinanten Polymerasen von der Zelle produziert werden. Da die Signalstärke

beider Antikörper in jeweils allen sechs Spuren vergleichbar ausfiel, wird außerdem deutlich, dass der chemische Knockdown des endogenen Proteins sehr gut funktioniert hat und fast ausschließlich die exogene Polymerase II vorliegt. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Polymerasen der Zelllinie S5A 48 größtenteils nicht funktionstüchtig waren, da ein Großteil der Zellen nach 24 Stunden entweder bereits tot war, oder im Begriff war abzusterben (Abb. 14, Spur 5). Betrachtet man nun genauer die Reaktivitäten der verschiedenen CTD-Phosphorylierungs-Antikörper, fällt zum einen auf, dass die Mutanten in denen die jeweilige Phosphorylierungsstelle fehlt, nicht erkannt wurden (\*). Die schwachen Signale in den jeweiligen Spuren, dürfte auf eine kleine Anzahl verbliebener endogener Polymerase-Moleküle zurückzuführen sein (z.B. Abb. 14,  $\alpha$ Ser2-P bei S2A 48, Spur 3). Fehlende Signale bei anderen Mutanten gaben zusätzliche Informationen über das Erkennungsepitop einzelner Antikörper (-). So ist ein unmodifiziertes Threonin an Position 4 der Wiederholungseinheit Voraussetzung dafür, dass der Phosphoserin-5-Antikörper binden kann (Abb. 5, Abb. 14). Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre aber z.B. auch, dass die vorangehende Phosphorylierung einer anderen Aminosäure für die direkte oder indirekte Rekrutierung der verantwortlichen Kinase essenziell ist, und daher z.B. bei der S5A 48 keine Serin-7-Phosphorylierung auftreten kann. Hier zeigt sich wieder die Problematik, dass ein negatives Ergebnis mindestens zwei Ursachen haben könnte, das tatsächliche Fehlen der Modifikation oder die Hemmung der Antikörperbindung.

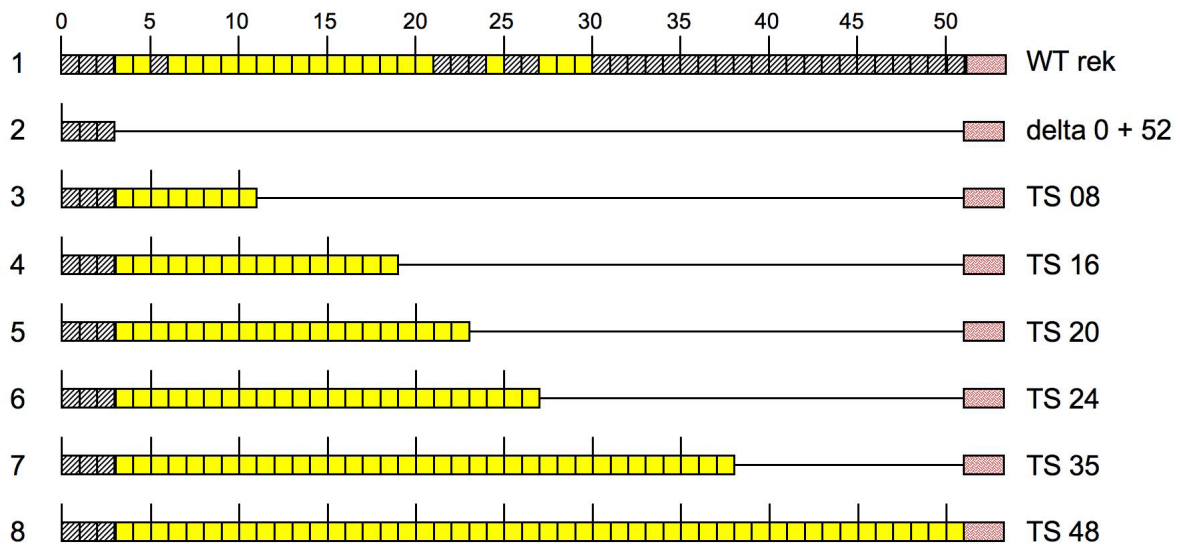
### 3.3.2 Die Bedeutung der CTD-Länge

Um neben der Sequenz der CTD-Wiederholungseinheit auch die Rolle der CTD-Länge zu charakterisieren, wurde die Phosphorylierung der Wildtyp-Polymerase mit rekombinanten Polymerasen mit unterschiedlicher Anzahl an Wiederholungen verglichen. Wie in Abbildung 15A schematisch dargestellt wurde, reichte die CTD-Länge der verwendeten Konstrukte dabei von 4 (delta 0+52) bis 52 (WT rek, TS 48) Wiederholungen. Analog zu den Austausch-Mutanten wurde die Viabilität der einzelnen Zelllinien nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen untersucht (Abb. 15B). Während Zellen mit Polymerasen ohne bzw. fast ohne CTD fast augenblicklich abstarben (delta 0+52, TS 08), stieg die Überlebensrate mit jeder zusätzlichen Wiederholungseinheit (TS 16 bis TS 24). Die kritische Länge scheint um die 39

## Ergebnisse

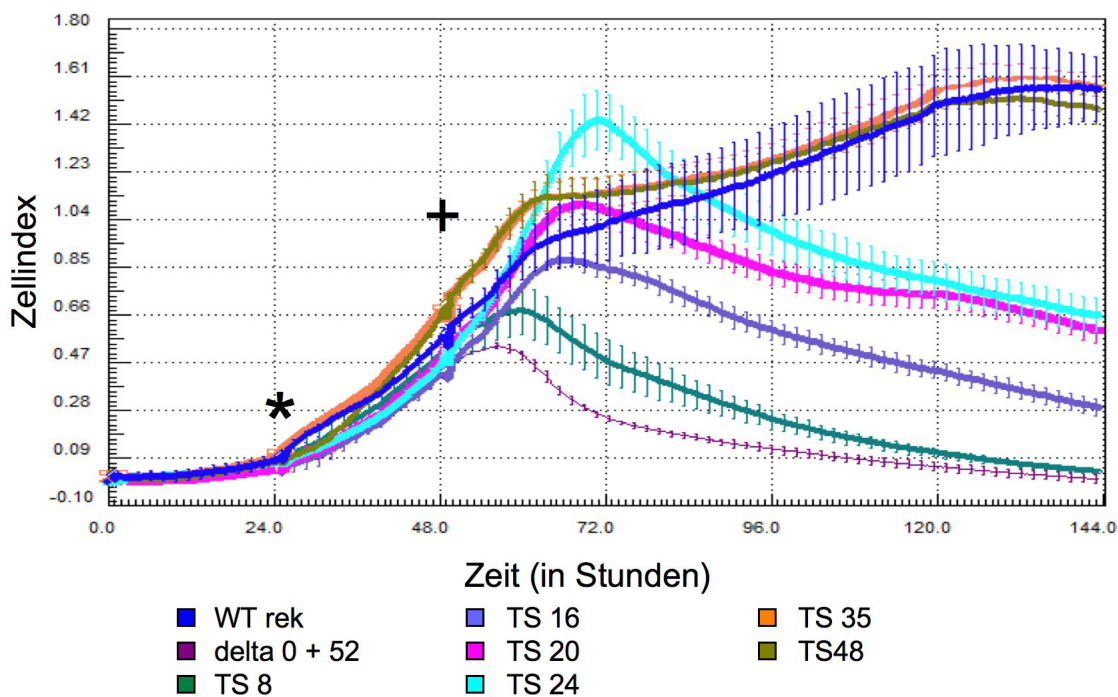
Wiederholungen zu sein (TS 35), denn ab dieser CTD-Länge waren die Wachstumskurven fast identisch zu der des rekombinanten Wildtyps.

### A



■ YSPTSPS ■ Nicht-Konsensus-Wdh. ■ CTD52

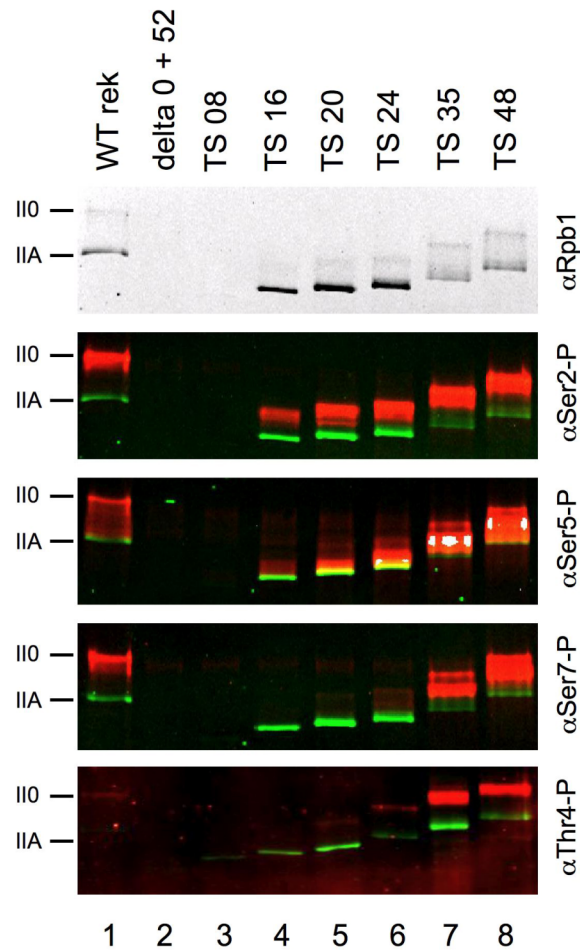
### B



**Abb. 15. Untersuchung der Bedeutung der CTD-Länge.** (A) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der verschiedenen synthetischen CTD-Längen-Mutanten. (B) Proliferations-Assay von HEK 293-Zellen während und nach transients Transfektion mit den synthetischen CTD-Mutanten (\*) und dem chemischen Knock-Out der endogenen Polymerase II durch  $\alpha$ -Amanitin (+).

## Ergebnisse

Sollten alle CTD-Wiederholungen ähnlich zugänglich für CTD-Kinasen sein, würde man einen gleichmäßigen Anstieg der Phosphorylierungssignale proportional zur CTD-Länge erwarten. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen und um gleichzeitig zu klären, ob bestimmte Modifikationen eine bestimmte Anzahl an CTD-Wiederholungen voraussetzen, wurde mit Hilfe des konditionalen Expressionssystem der Phosphorylierungsstatus der Längenmutanten erfasst (Abb. 16).



**Abb. 16. Phosphorylierung der CTD nach Manipulation ihrer Länge.** Western-Analyse von Gesamtzell-Lysaten 48h nach Induktion der synthetischen CTD-Mutanten und 24h nach Zugabe von  $\alpha$ -Amanitin. Um die Expression der exogen-exprimierten,  $\alpha$ -Amanitin-resistenten Polymerase zu zeigen, wurden die Membranen sowohl mit Antikörper gegen die verschiedenen Modifikationen (rote Banden), als auch mit einem Antikörper gegen das HA-Tag (12CA5, grüne Banden) inkubiert. Weiße Banden bedeuten eine Sättigung des roten Signals.

Die Polymerasen der Zelllinien delta0+52 und TS 08 waren nicht fähig ihre eigene Expression zu unterstützen und zeigten daher weder Phosphorylierungssignale (rot), noch Signale für die große Untereinheit der Polymerase (Abb. 16 oben,  $\alpha$ Rpb1, Spur 2 und 3). Die rekombinanten Polymerasen mit 16 bis 24 Konsensus-Wiederholungen

wurden mehrheitlich nicht effizient phosphoryliert und akkumulierten in der Pol IIA-Form (grün). Innerhalb der Pol II0-Form ergab das Phosphoserin-2-Signal ein scharfe, langsam wandernde Bande, während Phosphoserin-5 v.a. in den Mutanten mit längeren CTDs (TS 35 bis TS 48), eine Bande ergab, die zwischen Pol II0 und IIA lief (weiße Absättigung). Dies deutet auf mindestens 2 unterschiedliche Polymerase-Populationen hin, die *in vivo* existieren: Polymerasen, die allein an Serin-2 phosphoryliert sind, und Polymerasen die ausschließlich eine Serin-5-Phosphorylierung tragen. Interessanterweise zeigten erst die Mutanten mit einer CTD-Länge von 35 oder mehr Wiederholungseinheiten eine signifikante Phosphorylierung von Threonin-4 und Serin-7. Also eben die Zelllinien, die auch in den Proliferationsexperimenten eine Wachstumskurve gleich dem Wildtyp zeigten. Zusätzlich zu den einzelnen Phosphorylierungen trat außerdem allgemein eine deutlich stärkere Pol II0-Bande bei den Zelllinien TS 35 und TS 48 auf. Das Verhältnis zwischen IIA- und II0-Form lag hier bei ungefähr zwei zu eins, während bei den kürzeren CTDs, trotz massiver Expression der rekombinanten Polymerase, kaum eine II0-Bande zu sehen ist ( $\alpha$ Rpb1, Spur 4-6).

### **3.4 Die Identifikation der Serin-7-Kinase in Säugetieren**

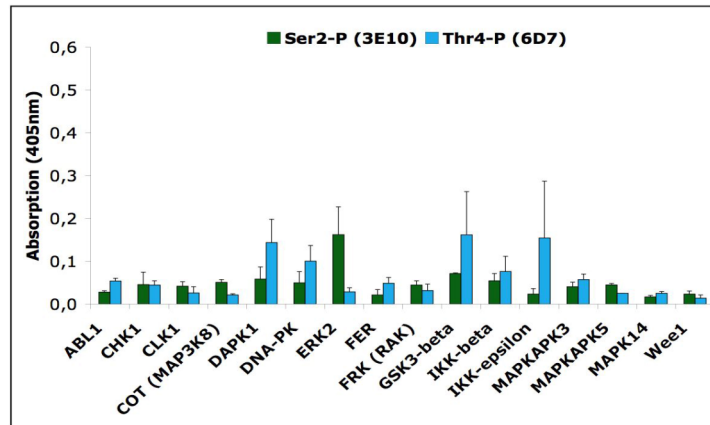
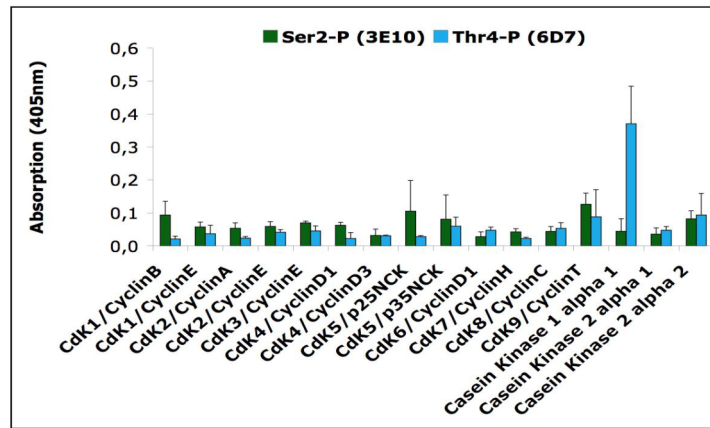
Nachdem die Existenz der bisher unentdeckten Phosphorylierungen, sowohl in der Hefe als auch in Säugetieren nachgewiesen wurde und die Spezifität der monoklonalen Antikörper durch die rekombinanten Polymerasen bestätigt wurde, war der nächste Schritt herauszufinden, welche Kinasen für diese Modifikationen verantwortlich sein könnten. Der Fokus lag hierbei auf der Charakterisierung der Serin-7-Kinasen.

#### **3.4.1 Die Charakterisierung potenzieller CTD-Kinasen *in vitro***

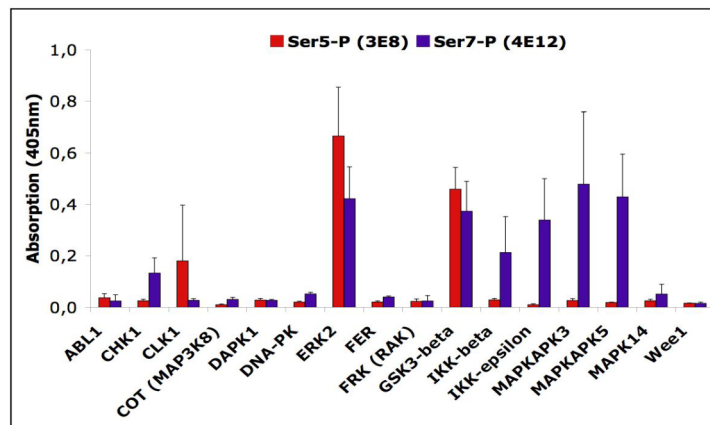
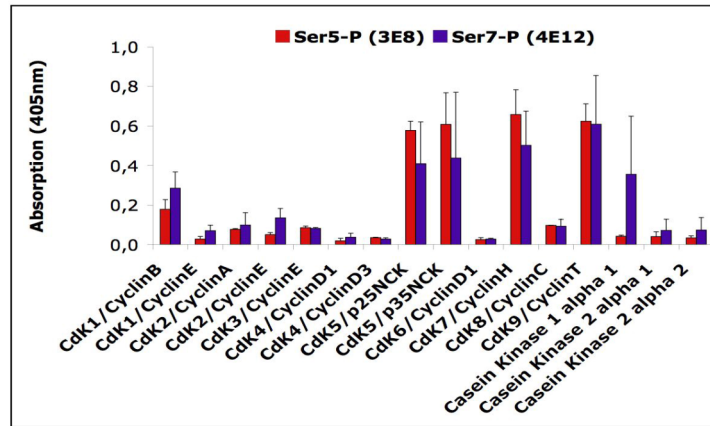
Um diese Frage zu beantworten wurden 80 aufgereinigte Ser/Thr-Kinasen *in vitro* getestet. Hierzu wurden die Kinasen samt etwaiger Kofaktoren mit einem CTD-Peptid, bestehend aus vier Konsensus-Wiederholungen (TS 04), inkubiert und der Phosphorylierungsstatus des Peptids danach mithilfe der verschiedenen CTD-Antikörper in ELISA-Experimenten ermittelt (Abb. 17 und Appendix Abb. A1).

# Ergebnisse

## A



## B

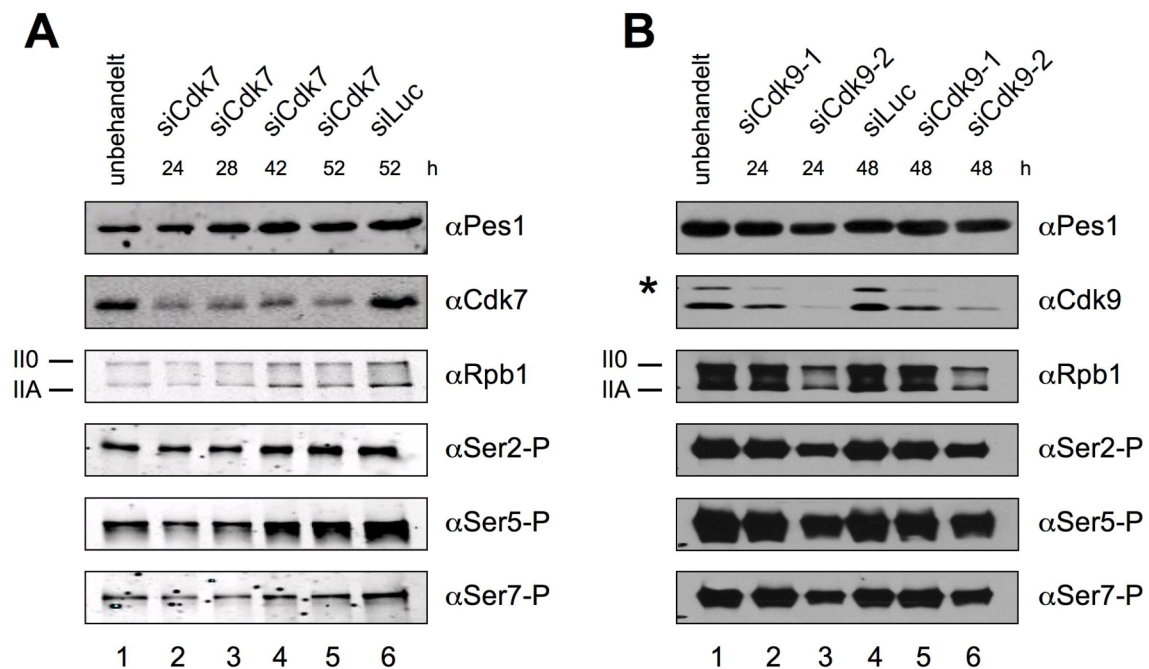


**Abb. 17. Welche Kinasen sind verantwortlich für CTD-Phosphorylierung in Säugetieren?** ELISAs zu *in vitro*-Kinase-Untersuchungen: CTD-Peptide (4 Wiederholungseinheiten), wurden mit aufgereinigten Säugetier-Kinasen und deren korrespondierenden Cyclinen inkubiert. (A) Phosphorylierungs-Aktivität der analysierten Kinasen auf Serin-2 (grün) und Threonin-4 (türkis). (B) Phosphorylierungs-Aktivität der analysierten Kinasen auf Serin-5 (rot) und Serin-7 (aubergine).

Obwohl mit insgesamt 16 Serin- und Threoninresten eine Fülle möglicher Phosphorylierungsstellen angeboten wurde, zeigte nur eine geringe Zahl der Kinasen eine deutliche Aktivität auf diesem Substrat. Neben den bereits als CTD-Kinasen identifizierten Enzymen CDK7, CDK9 und ERK2 (Palancade and Bensaude, 2003) zeigten GSK3 und vor allem CDK5 mit seinen beiden korrespondierenden Cyclinen die deutlichste Aktivität für Serin-5- und gleichzeitig für Serin-7-Phosphorylierung. Unter den Kinasen die allein Serin-7 phosphorylierte stach in sämtlichen Experimenten die Kinase MAPKAPK5 (für *Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 5*), kurz MK5, hervor. Hierbei handelt es sich um eine Ser/Thr-Kinase die als Antwort auf zellulären Stress und entzündungsfördernde Zytokine von MAP-Kinasen, wie MAPK14, ERK2 und ERK3 (Aberg et al., 2009) phosphoryliert und somit aktiviert wird.

### 3.4.2 Die Auswirkung von Kinase-Hemmung auf die Phosphorylierung der CTD

Um zu testen ob es sich bei den Kinasen, die *in vitro* die CTD phosphoryliert haben, auch *in vivo* um CTD-Kinasen handelt, wurden Knockdown-Experimente in U2OS-Zellen durchgeführt, in denen die Expression besagter Kinasen mithilfe von RNA-Interferenz gehemmt wurde. Bei MK5 wurden Zelllinien (MEF) verwendet, in denen MK5 bzw. ERK3 entweder genomisch „ausgeknockt“ war oder aber überexprimiert wurde. Obwohl der siRNA-Knockdown ca. 90% der Expression der jeweiligen Kinasen im Vergleich zur Kontrolle hemmte, konnte weder in diesen Versuchen, noch in den MK5-Zelllinien eine Veränderung in der CTD-Phosphorylierung festgestellt werden (Abb.18 und A2/A3).



**Abb. 18. Manipulation der identifizierten CTD-Kinasen.** (A) Western-Analyse nach siRNA-Knockdown der TFIIH assoziierten Kinase CDK7 in U2OS-Zellen. (B) Western-Analyse nach siRNA-Knockdown von CDK9 in U2OS-Zellen. Hier wurden 2 verschiedene siRNAs verwendet. SiCdk9-1 bewirkt hauptsächlich einen Knockdown der nukleolären Form von Cdk9 (\*), siCdk9-2 reduziert die Expression von Cdk9 allgemein.

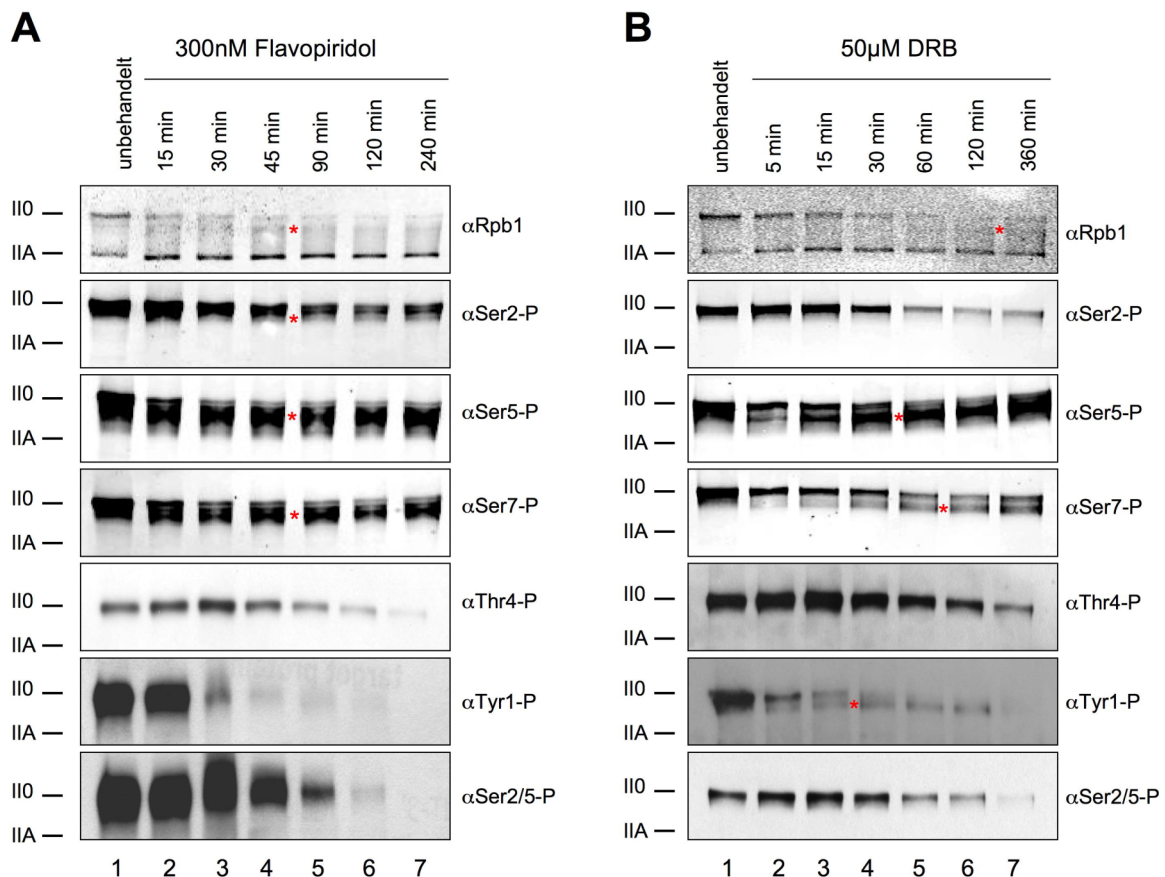
Selbst bei der Transfektion mit siRNAs gegen die bereits bekannten CTD-Kinasen, wie CDK7 (Abb.18A) bleibt das Phosphorylierungsmuster der CTD beinahe konstant. Bei dem siRNA-Knockdown gegen CDK9 kam es zu einer deutlichen Reduktion der Polymerase II ( $\alpha$ Rpb1, siCdk9-2, Spur 3 und 6), während die Ladungskontrolle keine Unterschiede aufwies. Der Grund hierfür könnte sein, dass die Zellen zwar noch nicht vollständig abgestorben waren, sich aber auf dem Weg in die Apoptose befanden. Ein grundlegendes Problem der siRNA-vermittelten Herab-Regulation der Kinasen war außerdem, dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob nun die verbleibenden 10% der Kinase-Moleküle ausreichend waren, um den Phosphorylierungsgrad zu halten, oder eine redundante Kinase die Lücke ausfüllte. Nachdem die RNAi-Experimente keine Antwort bezüglich der CTD-Kinasen liefern konnten, wurden Zeit-Kinetiken mit Kinase-Inhibitoren angelegt und deren Auswirkung auf die CTD-Modifikationen analysiert. Hierzu wurden CDK9 (Abb. 19) in U2OS-Zellen mithilfe von Flavopiridol (300nM) bzw. 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-Ribofuranosylbenzimidazol (=DRB, 50 $\mu$ M) gehemmt. Nach unterschiedlichen



## Ergebnisse

Zeitspannen wurden Gesamtzell-Lysate angefertigt und in der Western-Analyse untersucht. Zusätzlich wurden Inhibitions-Kinetiken mit ERK 1/2-Hemmstoffen durchgeführt (Abb. A4)

Die Hemmung von CDK9 führte in beiden Fällen zu einem raschen Übergang der Pol II<sub>0</sub>- in die Pol II<sub>A</sub>-Form (Abb. 19 A und B, oben). Ähnlich wie in den bereits beschriebenen Stress-Experimenten (siehe 3.2) führte die Behandlung der Zellen zudem zu einer Abnahme der Threonin-4- und der Serin-2-Phosphorylierung. Im Gegensatz zu den Stress-Kinetiken kam es jedoch ebenfalls zu einer rapiden Reduktion der Tyrosin-1-Phosphorylierung. Während unter Behandlung der Zellen mit Sorbitol oder Wasserstoff-Peroxid eine schwache, Phosphoserin-5-reaktive IIM-Bande erschien, ging unter CDK9-Hemmung der Großteil der Serin-5- und Serin-7-Phosphorylierung von der Pol II<sub>0</sub>-Form in diese Form über (\*).



**Abb. 19. Veränderungen des Phosphorylierungsmusters nach chemischer Hemmung.** Western-Analyse der CTD-Modifikationen nach Hemmung von CDK9 in U2OS-Zellen durch (A) 300nM Flavopiridol und (B) 50µM DRB. (\*) kennzeichnet eine, nach CDK9-Hemmung zusätzlich auftretende Polymerase-Population, die neben Phosphoserin-7 hauptsächlich Phosphoserin-5-reaktiv ist.

Da die Cyclin-abhängigen Kinasen große Homologien in ihrer Struktur, und dabei besonders bezüglich der ATP-Bindetasche, aufweisen haben CDK-Inhibitoren nur bedingte Spezifität innerhalb dieser Enzym-Familie. Da außerdem neben der Serin-2- auch die Tyrosin-1- und Threonin-4-Phosphorylierungen von der Hemmung betroffen waren, blieb die Frage offen, welche CTD-Phosphorylierungsstellen von CDK9 direkt modifiziert werden, welche Modifikationen nur indirekt von der CDK9 Hemmung betroffen waren und welche anderen Kinasen gleichzeitig inhibiert wurden.

### **3.5 Die Identifikation der Serin-7-Kinase in *S. cerevisiae***

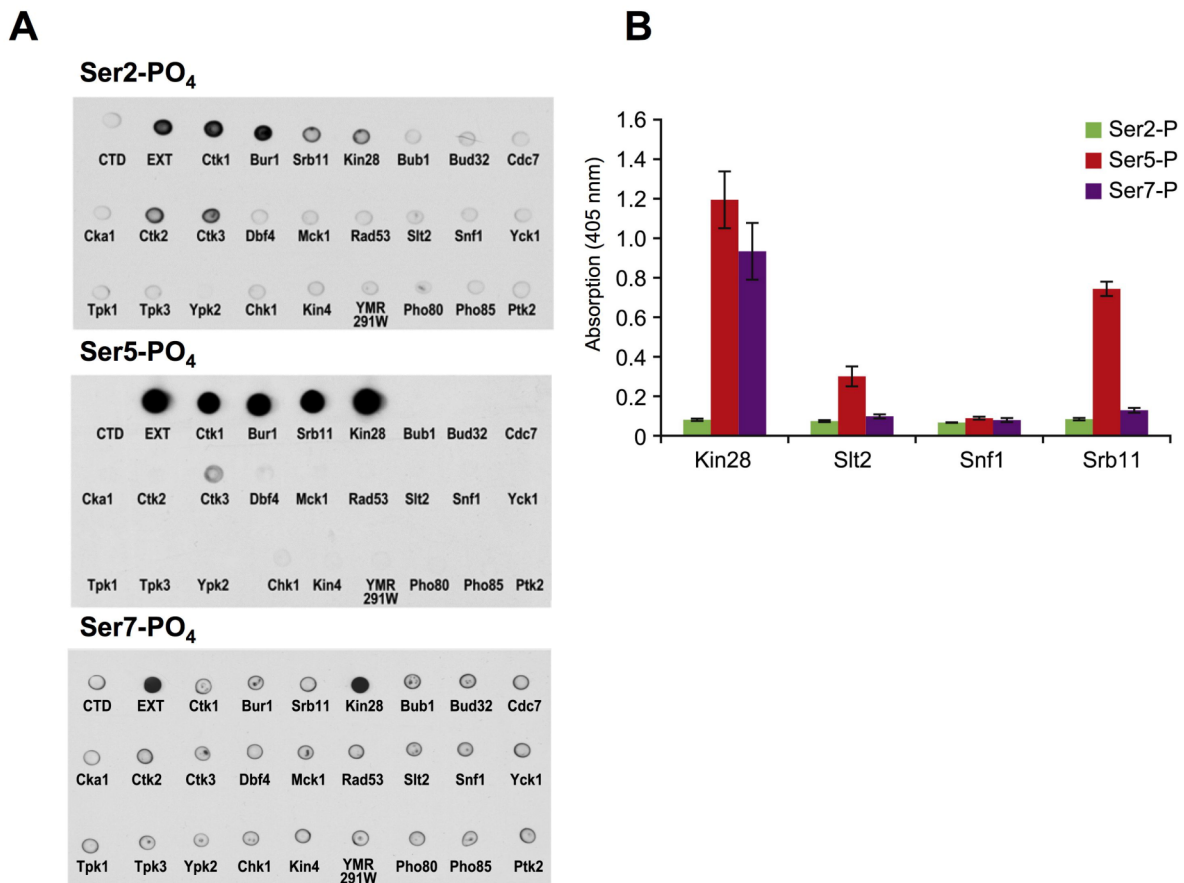
Da in den vorangegangenen Experimenten nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Enzyme für die neuentdeckte CTD-Phosphorylierung an Serin-7 in Säugetierzellen verantwortlich sind, wurde ein anderer Weg eingeschlagen, um diese Frage zu klären. Da die Serin-7-Phosphorylierung von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist (Abb. 6 und 7) und für die CTD-Kinasen, die Serin-2 und Serin-5 modifizieren das gleiche gilt, war es sehr wahrscheinlich, dass die Serin-7-Kinase auch durch chemisch-genomische Analysen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden könnte (Knight und Shokat, 2005).

#### **3.5.1 Die TFIIH-assoziierte Kinase Kin28 phosphoryliert Serin-7 *in vitro***

Hierzu wurde der Fokus auf Hefe-Kinasen gelegt, die sich während logarithmischen Wachstums in nährstoffreichem Medium im Zellkern befinden (Kumar et al., 2002). Dreiundzwanzig dieser Enzyme lagen bereits mit dem TAP-Epitop (*Tandem Affinity Purification*) markiert vor, das jeweils am 3'-Ende der Kinase-kodierenden Region genomisch integriert war (Ghaemmaghami et al., 2003). Im Fall von Srb10, dem Homolog zu CDK8 der Säugetiere, wurde eine TAP-Fusion an dem korrespondierende Cyclin (Srb11) verwendet, um den funktionalen Cyclin-Kinase-Komplex aufzureinigen. Da die Cycline häufig dafür zuständig sind, ihre assoziierten Kinasen zum richtigen Substrat zu dirigieren, wurde das Cyclin Ctk2, das mit Ctk1, dem Homolog zu CDK9, assoziiert ebenfalls aufgereinigt. Aus dem selben Grund wurde außerdem noch Pho80 aufgereinigt, das mit Pho85, dem funktionellen Homolog von CDK5, assoziiert.

## Ergebnisse

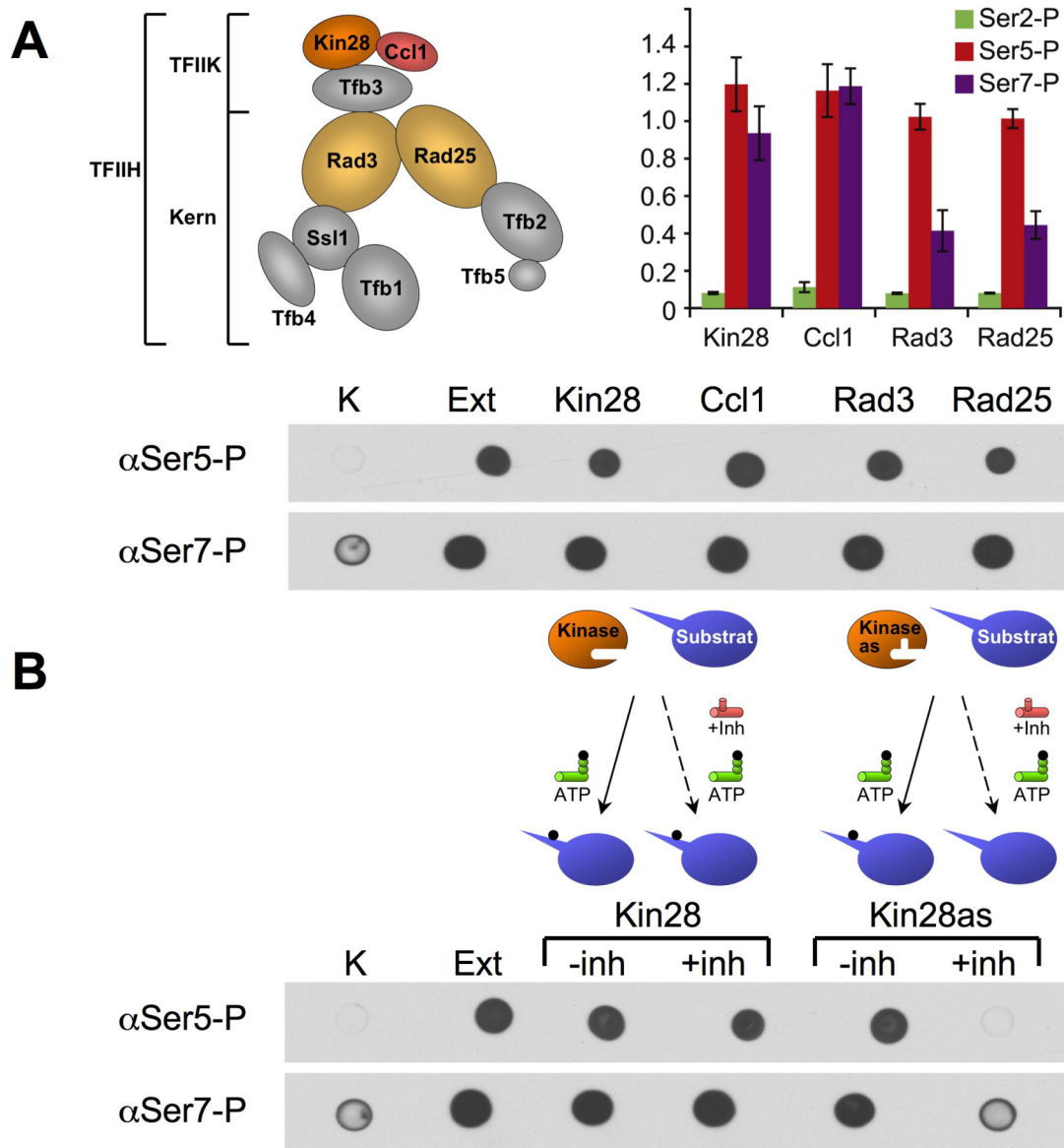
Die Enzyme wurden nach der Aufreinigung aus der Hefe auf ihre Fähigkeit, rekombinante CTD zu phosphorylieren untersucht. Wie in Abbildung 20A zu sehen ist, zeigten Immun-Detektionen, in denen die Serin-2- und Serin-5-Phosphorylierung analysiert wurden, positive Signale für genau die Kinasen, von denen bereits bekannt war, dass sie im Stande sind, diese Reaktion durchzuführen. Ctk1 und Bur1 phosphorylierten demnach Serin-2, während Serin-5 zusätzlich noch von Kin28 und Srb10 modifiziert wurde (Abb.20A oben und mittig). Serin-7 wurde in dieser Untersuchung alleine von Kin28, dem Homolog der Hefe zu CDK7, phosphoryliert (Abb. 20A unten). Um das Ausmaß der Phosphorylierung an Serin-5 und -7 durch Kin28 zu quantifizieren, wurden zusätzlich noch ELISAs durchgeführt.



**Abb. 20. Hefe-Kinasen in der *in vitro*-Kinase-Untersuchung.** (A) Analyse der Aktivität aufgereinigter Hefe-Kinasen auf GST-CTD mittels Immun-Detektionen gegen Serin-2-, Serin-5- und Serin-7-Phosphorylierung. (B) ELISA zur Analyse der Aktivität bestimmter Kinasen auf synthetischen CTD-Peptiden (4 Wiederholungseinheiten).

Das Ergebnis zeigte, dass Kin28 Serin-7 und Serin-5 mit etwa gleicher Effizienz phosphorylierte, während die andere Serin-5-Kinase, Srb10, Serin-7 nicht phosphorylierte (Abb.20B). Die MAP-Kinase Slit2 sowie Snf1, das Homolog der Hefe

von AMPK, die bereits in der ersten Untersuchung (Abb. 20A) kein Signal gaben, wurden hier als Negativ-Kontrolle mitgeführt.



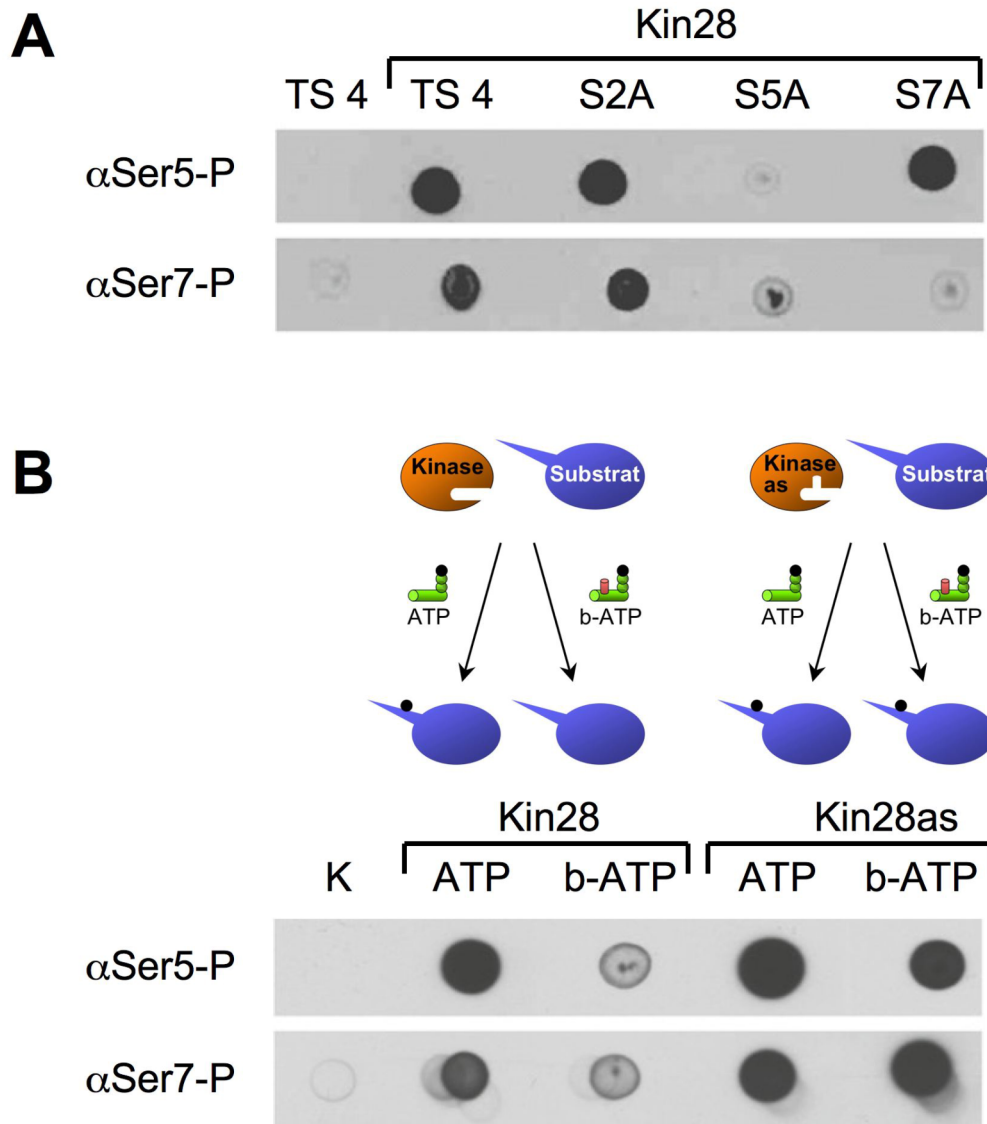
**Abb. 21. Die Phosphorylierung von Serin-7 ist Kin28-abhängig.** (A) Schematische Darstellung (oben links) der verschiedenen Untereinheiten des TFIIK- und des TFIIH-Kern-Komplexes. Analyse der Kinase-Aktivität der mittels TAP-Tag-markierter Untereinheiten (Kin28, Ccl1, Rad3, Rad25) aufgereinigten TFIIH-Komplexes auf GST-CTD (unten) bzw. TS 04 (ELISA). (B) Schematische Darstellung (oben) der Bindung von ATP (grün) und des spezifischen Inhibitors (magenta) in die katalytische Tasche der Wildtyp-Kinase bzw. der analog-sensitiven, mutierten Kinase (as, Kin28-L83G). Immun-Detektionen von GST-CTD, phosphoryliert durch Kin28 und Kin28as mit und ohne Zugabe des spezifischen Inhibitors.

Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) sind promiske Enzyme und die Wahl ihrer Substrate wird von ihren Cyclinen gelenkt, die spezifische Ziel-Proteine rekrutieren. Die Präferenz von CDK7, dem menschlichen Homolog von Kin28, für ein bestimmtes Substrat wird durch die anderen Untereinheiten des TFIIH-Komplexes vermittelt. Daher könnte Kin28 innerhalb des TFIIH-Komplexes eine unterschiedliche Substrat-Selektivität aufweisen als die freie Kinase. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch TFIIH-assoziierte Kin28 das Serin-7 der Pol II-CTD phosphoryliert. Kin28 assoziiert mit dem Cyclin Ccl1 und einem dritten Partner (Tfb3) um den aktiven TFIIK-Komplex zu bilden, der das Serin an Position 5 der CTD-Wiederholungseinheiten phosphorylieren kann. TFIIK wiederum bindet mit dem sogenannten Kern-Komplex, der aus weiteren sieben Untereinheiten besteht, und bildet so den vollständigen TFIIH-Komplex (Abb. 21A, oben links).

Um nun herauszufinden, ob die Aktivität von Kin28 bezüglich der Phosphorylierung von Serin-7 von einer Interaktion mit dem TFIIH-Komplex beeinträchtigt wird, wurde TFIIH mithilfe verschiedener TAP-fusionierter Untereinheiten des Komplexes aufgereinigt und hinsichtlich der Serin-7-Kinase-Aktivität untersucht. In jedem der analysierten Fälle phosphorylierte die assoziierte Kin28-Kinase Serin-7 fast genauso effizient wie Serin-5 (Abb. 21A, oben rechts). Diese Ergebnisse zeigen, dass TFIIH-assoziierte Kin28, trotz erhöhter Substratspezifität, das Serin an Position-7 der CTD-Wiederholungen phosphoryliert.

Da der TFIIH-Komplex aber noch mit einer großen Anzahl verschiedenster Proteine interagiert, wäre es möglich, dass eine andere Kinase, die ebenfalls an TFIIH bindet, für die Serin-7-Phosphorylierung verantwortlich ist. Um diese Bedenken ausschließen zu können, wurde der Versuch mit einer TAP-fusionierten Kin28 wiederholt, die so konstruiert wurde (Kin28 Leu83Gly), dass es ein sperriges Analogon eines Kinase-Inhibitors annehmen kann (Abb. A4). Diesem sperrigen Analogon ist es jedoch unmöglich, in die ATP-Bindetasche unmodifizierter Kinasen zu binden (Knight and Shokat, 2005). Im Gegensatz dazu, wird die konstruierte Kin28as (*analog sensitized*) bereits bei Konzentrationen im micro-molaren Bereich von dem konstruierten Inhibitor 1-NA-PP1 gehemmt (Abb. 21B oben; Kanin et al., 2007). Da sich der Inhibitor nicht in die unmodifizierte ATP-Bindetasche einfügen kann, wurde die Aktivität des Wildtyp-Kin28 nicht merklich gestört (Abb. 21B unten). Die TAP-fusionierte Kin28as, die unter normalen Bedingungen die gleiche Aktivität wie der Wildtyp aufweist, war nach Zugabe des Inhibitors weder in der Lage Serin-

5, noch Serin-7 zu phosphorylieren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Kin28 direkt, und nicht eine andere TFIIH-assoziierte Kinase, für die Phosphorylierung von Serin-7 verantwortlich ist.



**Abb. 22. Kin28 phosphoryliert CTD-Serin-7 direkt.** (A) Immun-Detektion der CTD-Phosphorylierung in TS 04 und den unterschiedlichen Austauschmutanten. (B) Schematische Darstellung (oben) der Fähigkeit von Kin28as das ATP-Analogon N<sup>6</sup>-Benzyl-ATP (b-ATP) als Kofaktor zu verwenden. Kinase-Aktivität (unten) von Kin28 und Kin28as auf GST-CTD mit und ohne N<sup>6</sup>-Benzyl-ATP.

Da es einen Hinweis darauf gibt, dass in Säugetierzellen die Serin-7-Phosphorylierung von einer vorausgehenden Serin-5-Phosphorylierung durch CDK7 abhängen könnte (Chapman et al., 2007), wäre es durchaus möglich, dass

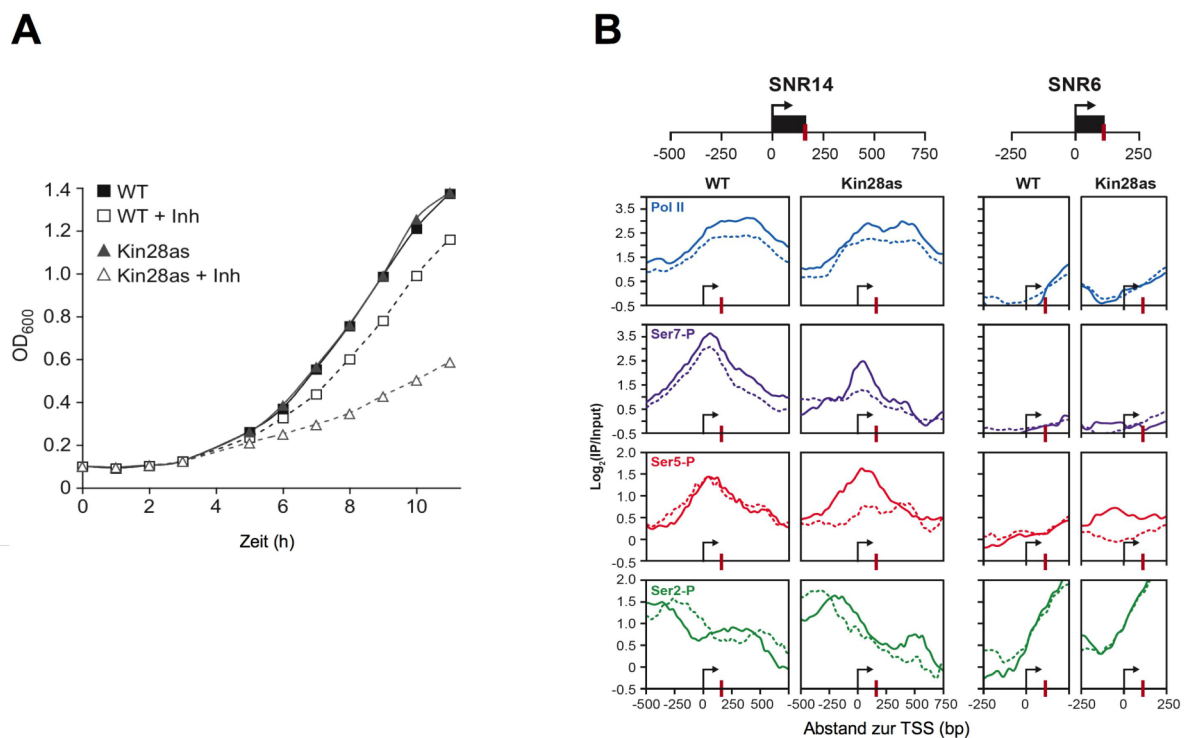
diese Rangfolge auch in der Hefe existiert. Die Hemmung der Serin-5-Phosphorylierung würde in diesem Fall eine anschließende Phosphorylierung von Serin-7 durch eine andere Kinase blockieren. Aus diesem Grund wurde die Fähigkeit von Kin28 *in vitro* getestet, rekombinante CTD-Peptide, in denen jeweils Serin-2, -5 oder -7 durch ein Alanin ausgetauscht wurden, zu phosphorylieren.

Die Immun-Detektionen zeigten, dass weder ein Alanin an Position 2 noch an Position 7 die Fähigkeit von Kin28 Serin-5 zu phosphorylieren sichtbar beeinträchtigten (Abb. 22A). Im Gegensatz dazu verringerte ein Austausch von Serin-5 zu Alanin die Aktivität von Kin28 bezüglich der Phosphorylierung von Serin-7 dramatisch. Diese Beobachtung deckte sich mit den gewonnenen Erkenntnissen aus der *in vivo*-Untersuchung der rekombinanten Polymerasen in Säugetier-Zellen, da auch dort der Austausch von Serin-5 zu Alanin eine Abnahme der Serin-7-Phosphorylierung zur Folge hatte (Abb. 14, links unten). Dieses Ergebnis könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen liegt Serin-5 im Erkennungsepitop des Serin-7-Antikörpers (Abb. 5) und könnte in unmodifizierter Form essenziell für die Bindung des selbigen sein. Andererseits wäre es gut möglich, dass eine Phosphorylierung von Serin-5 die Voraussetzung für die Rekrutierung der Serin-7-Kinase darstellt. Weitere Erklärung sollte im folgenden Experiment genauer untersucht werden. Um zu beweisen, dass Kin28 sowohl Serin-5, als auch Serin-7 direkt phosphoryliert, und nicht eine andere Phosphoserin-5-abhängige Kinase, wurde N<sub>6</sub>-Benzyl-ATP (Abb. A5) als Phosphat-Donor in der Reaktion mit Kin28 und Kin28as verwendet. Dieses modifizierte ATP kann nur in die erweiterte ATP-Bindetasche von Kin28as binden und kann nicht von unmodifizierten Kinasen als Phosphat-Donor verwendet werden. Das Auftreten der Serin-7-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen bestätigte, dass Kin28as sowohl Serin-5 als auch Serin-7 der Pol II-CTD-Wiederholungseinheit direkt phosphoryliert (Abb. 22B).

### **3.5.2 Kin28 phosphoryliert Serin-5 und Serin-7 *in vivo***

Um die Rolle von Kin28 *in vivo* zu untersuchen, wurden die Folgen der chemischen Hemmung des Enzyms auf das Serin-7-Phosphorylierungsmuster untersucht. Hierzu wurde ein Hefestamm verwendet, indem das Kin28as-Allel ins Genom integriert war. Unter Standardbedingungen wuchs der Kin28as-Stamm

gleich dem Wildtyp-Stamm, die Zugabe von micro-molaren Konzentrationen des Zellwand-durchlässigen Inhibitor 1-NA-PP1 führte jedoch zu einer deutlichen Verringerung der Proliferation, während das Wachstum des Wildtyp-Stammes unter diesen Bedingungen kaum beeinträchtigt wurde (Abb. 23A). Vorherige Analysen von Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) zeigten, dass die Serin-5-Phosphorylierung in Kin28as-Stämmen innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe des Hemmstoffes deutlich reduziert wird (Kanin et al., 2007).



**Abb. 23. *In vivo*-Hemmung von Kin28 beeinflusst das Serin-7-Phosphorylierungsmuster.** (A) Wachstumskurven des Wildtypstammes (WT) und der analog-sensitiven Kin28-Punktmutante (Kin28as) mit und ohne Zugabe der Inhibitoren (Zugabe von 2 $\mu$ M 1-NA-PP1 und 4 $\mu$ M 1-NM-PP1 bei einer OD<sub>600</sub>=0.5 für 30 min). (B) ChIP-Chip-Profile zweier snRNAs. Gezeigt werden die Dichte-Profile von Pol II (blau), Ser7-P (aubergine), Ser5-P (rot) und Ser2-P (grün) am Locus von SNR14 und SNR6 (Kontrolle). Ungehemmte Profile werden als durchgehende Linien dargestellt, Profile der chemisch-inhibierten Zellen werden als unterbrochene Linien gezeigt. Die Transkriptionsstartstelle (TSS, Pfeil) und die RNA-Prozessierungsstelle am 3'-Ende (roter Balken) sind gekennzeichnet.

Es wurden hochauflösende Tiling-Microarrays verwendet um die Profile der Phosphoserin-5- und Phosphoserin-7-Modifikationen der CTD zu untersuchen. Aufgrund der Bedeutung der Serin-7-Phosphorylierung bei der Expression der snRNA-Gene der Säugetiere (Egloff et al. 2007) wurde der Fokus dabei auf die



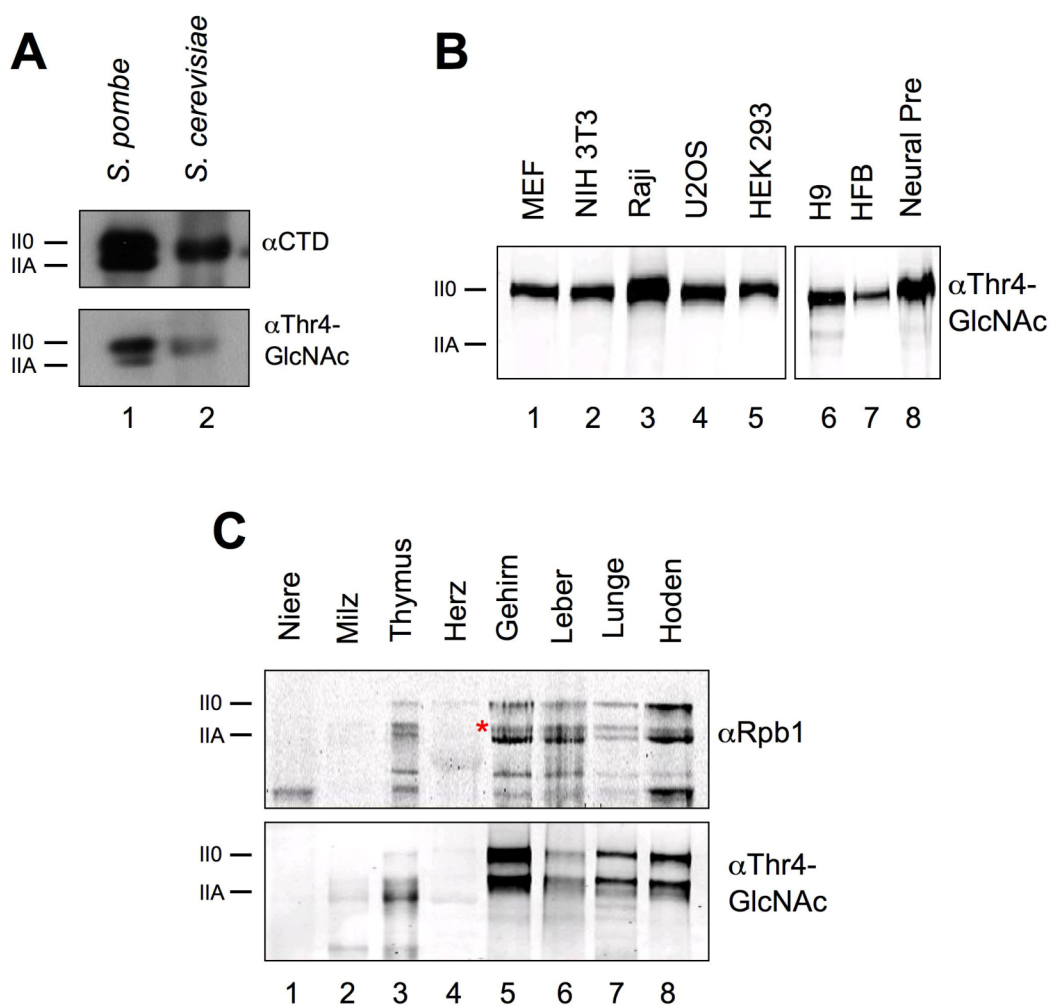
snRNA-Gene der Hefe gelegt, die für die Transkripte des Spleißosoms kodieren. Bei allen fünf snRNA-Genen spiegelte das Profil der Serin-7-Phosphorylierung das der Serin-5-Phosphorylierung nahezu identisch wider (Abb. 23B und Akhtar, Heidemann et al., 2009). Als Negativ-Kontrolle diente SNR6, das für die U6-snRNA kodiert und von der RNA-Polymerase III transkribiert wird. Die Hemmung von Kin28 führte zur Entfernung der Phosphoserin-5- und der Phosphoserin-7-Peaks nahe der Transkriptions-Startstelle. Diese Ergebnisse bestätigten die vorangegangenen *in vitro*-Analysen und sprechen klar dafür, dass Kin28 auch *in vivo* Serin-5 und Serin-7 der CTD phosphoryliert. Da beide Phosphorylierungen jedoch nicht vollständig verschwanden, ist es sehr wahrscheinlich, dass neben Kin28 noch weitere Kinasen existieren, die im Stande sind, *in vivo* diese Modifikationen vorzunehmen.

### **2.6 Die Erweiterung des CTD-Kodes um eine weitere Variable**

Die einzigartige Zusammenstellung der Konsensus-Wiederholungseinheit ermöglicht neben der Phosphorylierung auch noch weitere Modifikationen innerhalb der CTD. So kann sie auch durch den Anhang eines N-Acetylglucosamin-Monosaccharides (O-GlcNAc) an die Hydroxylgruppen der Serin- und Threoninreste modifiziert werden (Kelly et al., 1993). Unserer Arbeitsgruppe ist es nun gelungen, Antikörper herzustellen, die ein glykosyliertes Threonin an Position 4 des CTD-Heptapeptids erkennen ( $\alpha$ Thr4-GlcNAc). Da ich im Laufe meiner Doktorarbeit verschiedene Polymerase-Populationen identifizieren konnte, die vom Laufverhalten der Pol IIA- und der Pol II0-Form abweichen, wurde untersucht, ob die O-Glykosylierung die Ursache hierfür sein könnte.

Zuerst wurde getestet, ob diese Modifikation *in vivo* nachzuweisen ist und in welcher Form sie sich dabei in der Western-Analyse darstellt. Überraschenderweise zeigte der Threonin-4-Glykosylierungs-Antikörper eine deutliche Reaktivität sowohl gegenüber der Pol II0-Form in Säugetierzellen (Abb. 24A), als auch in Hefezellen (Abb.24B). Überraschend deshalb, weil bisher davon ausgegangen wurde, dass sich Phosphorylierung und Glykosylierung der CTD ausschließen (Comer und Hart, 2001).

Da innerhalb der Mausgewebe neben der Pol II<sub>0</sub>-Form eine zweite hyperphosphorylierte Form entdeckt wurde, die aber deutlich schneller im SDS-Gel wandert, lag die Vermutung nahe, dass sich das Modifikationsmuster dieser Populationen anhand der Glykosylierung unterscheiden könnte. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen wurden die verschiedenen Mausgewebe in der Western-Analyse hinsichtlich der Threonin-4-Glykosylierung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass  $\alpha$ Thr4-GlcNAc deutliche Reaktivität gegenüber beiden Formen, Pol II<sub>0</sub> und Pol II<sub>X</sub>, aufwies (Abb. 24C).



**Abb. 24. Glykosylierung der CTD an Threonin-4.** (A) Gesamtzell-Lysate von Spalt- bzw. Bäckerhefe wurden mittels Western-Blot nach SDS-PAGE auf Thr4-GlcNAc untersucht. (B) Reaktivität des CTD-Glykosylierungs-Antikörper gegen Lysate verschiedener Säugetier-Zelllinien in der Western-Analyse nach SDS-PAGE. (C) Auftreten von Thr4-GlcNAc in murinen Gewebe-Proben. Die schneller laufende Pol II<sub>A</sub>-Form sowie die langsamer laufende Pol II<sub>0</sub>-Form sind gekennzeichnet, ebenso wie eine zusätzliche hyperphosphorylierte Bande (\*), die in sämtlichen murinen Geweben auftaucht.

Aus diesem Resultat ließen sich mehrere Erkenntnisse ableiten. Zum einen führen weder Phosphorylierung und Glykosylierung allein oder in Kombination zu dem veränderten Laufverhalten der Pol II<sub>0</sub>-Form. Viel wahrscheinlicher als Ursache hierfür wäre also eine Veränderung der Konformation durch die Isomerisierung der Proline an Position 3 und/oder 6 der CTD-Konsensus-Wiederholung oder eine dritte, bisher nicht nachgewiesene CTD-Modifikation. Zum anderen schließen sich Phosphorylierung und Threonin-4-Glykosylierung innerhalb der CTD nicht aus. Im Gegenteil, sie traten in den durchgeführten Experimenten sogar ausnahmslos in den gleichen Formen auf, wobei natürlich keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob sie dabei auch innerhalb der selben CTD-Wiederholungs-Einheiten vorkamen.

## 4. Diskussion

Die Kapazität von Organismen sich weiterzuentwickeln hängt von ihrer Fähigkeit ab ihre Funktionen zu verbessern und sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Unzulänglichkeiten in der genauen DNA-Replikation sowie umweltbedingte Schäden haben das Genom verändert, mit positiven wie negativen Ergebnissen. Gene wurden deletiert, dupliziert und eingeschoben, wodurch Gene mit neuer Funktion entstanden sind. Höhere Eukaryoten können ihr Repertoire an verschiedenen Genprodukten erweitern, indem alternative Promotoren und unterschiedliche Spleiß-Varianten genutzt werden um multiple Transkripte von ein und demselben Gen zu erhalten (Blencowe, 2006). Die Evolution der RNA-Polymerasen bildet dabei keine Ausnahme. Prokaryoten produzieren eine universelle RNA-Polymerase, während in Eukaryoten drei verschiedene RNA-Polymerasen (Pol I-III) unterschiedliche transkriptionelle Funktionen erfüllen. Neben Unterschieden in ihrer kodierenden Sequenz besitzen alle drei Polymerasen das gleiche, strukturell konservierte, aktive Zentrum (Cramer, 2001). Interessanterweise hat in höheren Organismen die größte Untereinheit der Pol II (Rpb1), im Gegensatz zu den Untereinheiten der anderen Polymerasen, eine einzigartige repetitive Struktur an ihrem Carboxy-Terminus entwickelt. Biochemische und genetische Studien zeigen, dass diese Domäne essenziell für mehrere Schritte der Regulation der Genexpression ist. Dazu zählen die Initiation der Transkription auf einem Chromatin-Templat bis zum Spleißen und der Prozessierung der entstehenden RNA-Transkripte (Sims et al., 2004; Phatnani und Greenleaf, 2006; Palancade und Bensaude, 2003). Die prokaryotische RNA-Polymerase besitzt keinerlei gleichwertige Struktur und kann RNA-Spleißen nicht unterstützen. Diese C-terminale Domäne (CTD) von Rpb1 ist aus Heptad-Wiederholungen zusammengesetzt, deren Anzahl sich mit zunehmender Komplexität der Organismen erhöht hat. So besteht die CTD der Säugetiere aus 52 Wiederholungen, während die CTD des Parasiten *Plasmodium yoelii* nur 5 dieser Heptad-Wiederholungen besitzt. Daraus ergibt sich, dass die CTD-Struktur zum einen aufgrund genetischer Instabilität erweitert wurde und zum anderen eine kritische Entwicklung durchlaufen hat, die eine Addition zusätzlicher CTD-Wiederholungen zur Folge hatte, wodurch ihre funktionelle Effizienz verbessert wurde. Eine Analyse von CTD-Strukturen unterschiedlicher Organismen bringt nicht

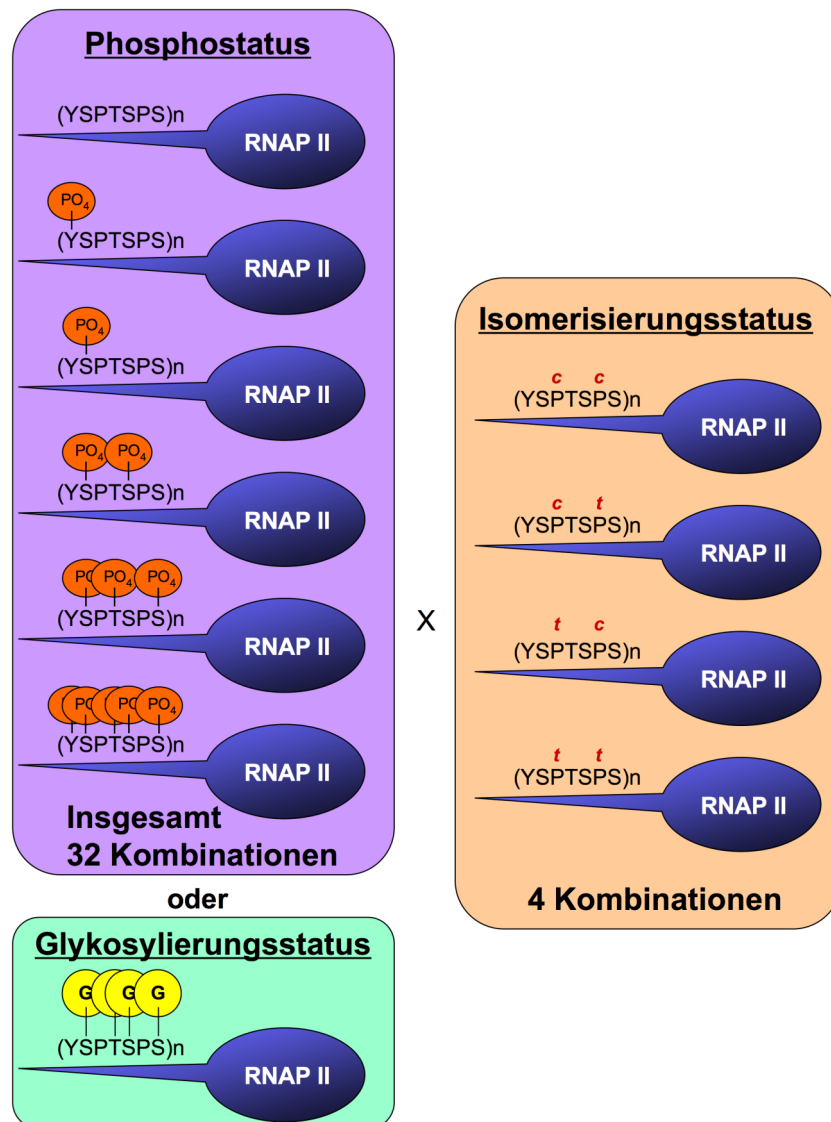
nur Unterschiede bei der Länge ans Licht, sondern auch bei der genauen Aminosäure-Sequenz der Heptapeptide (Chapman et al., 2008). Nichtsdestotrotz wurde die allgemeine Struktur der Siebener-Wiederholung über die Organismen hinweg beibehalten. Dennoch ist bisher unklar woher diese Sequenz ihren Ursprung hat und warum es ausgerechnet Siebener-Wiederholungen sind.

### 4.1 Die Generierung des CTD-Kodes

Das Potenzial des CTD-Heptapeptids an allen Aminosäureresten modifiziert zu werden ermöglicht eine Fülle von Signal-Kombinationen, die gleich einem binären Kode gelesen werden können, indem die An- bzw. Abwesenheit einer Modifikation die Interaktionen zwischen CTD und anderen Faktoren beeinflusst. Demzufolge wurde ein Modell erstellt, in dem unterschiedliche Modifikationen der Aminosäurereste innerhalb der Heptapeptide einen CTD-Kode generieren, der die zeitliche Abfolge, in der verschiedene Proteine rekrutiert werden, reguliert (Buratowski, 2003). Der Zugriff auf monoklonale Antikörper, die zwischen Heptapeptiden unterscheiden können, je nachdem welche Position der Konsensus-Wiederholung modifiziert ist, hat die Charakterisierung der Rolle der CTD in der Genexpression weit vorgebracht (Palancade und Bensaude, 2003). Dabei wurden zuerst Antikörper beschrieben die selektiv entweder eine Phosphorylierung der Serin-2-Reste oder der Serin-5-Reste erkennen (Patturajan et al., 1998). Demzufolge wurde die Phosphorylierung dieser beiden Aminosäurereste äußerst intensiv untersucht und stellt zwei Hauptdeterminanten des besagten CTD-Kodes dar. Berücksichtigt man nur diese beiden Modifikationen, sind folgende Phosphorylierungszustände möglich: Unphosphoryliert, Serin-2-phosphoryliert, Serin-5-phosphoryliert und an beiden Resten gleichzeitig, also Serin-2/5-phosphoryliert. Da die kommerziell erhältlichen Antikörper jedoch nur unzureichend charakterisiert waren, ist unklar, ob diese nur einzelne Phosphorylierungen pro CTD-Wiederholungseinheit oder auch die Doppel-Phosphorylierung erkennen können bzw. dieses Epitop sogar bevorzugen. Ziel meiner Arbeit war es, neben den beiden bekannten Phosphorylierungen, auch die restlichen Aminosäuren des Heptads auf ihr Modifikations-Potenzial zu untersuchen. Durch die Produktion neuer monoklonaler Antikörper war es mir nicht nur möglich, zwischen der Serin-2- (Antikörper 3E10), der Serin-5- (Antikörper 3E8) und der Serin-2/5-Phosphorylierung (Antikörper 3H7)

innerhalb einer CTD-Wiederholung zu unterscheiden, es ist zudem gelungen Antikörper gegen die verbleibenden denkbaren Phosphorylierungsstellen, Phosphotyrosin-1, Phosphothreonin-4 und Phosphoserin-7 herzustellen (Abb. 4). Mit Hilfe dieser Antikörper konnte ich die Phosphorylierung aller fünf potenziellen Modifikationsstellen *in vivo* darstellen. Interessanterweise ließ sich dabei die Tyrosin-1-Phosphorylierung nicht nur in Säugetieren, sondern auch in der Hefe, sowohl in *S. pombe* als auch in *S. cerevisiae*, nachweisen (Abb. 6 und 7). Diese Entdeckung ist überraschend, da der monoklonale Antikörper nicht gegen ein Peptid mit der CTD-Konsensus-Sequenz kreiert wurde, sondern gegen eine abweichende Peptid-Sequenz mit einem Lysin an Position 7 (Abb. 3). *In vitro* erkannte der Phosphotyrosin-1-Antikörper auch nur CTD-Peptide, bei denen dem phosphorylierten Tyrosin ein Lysin vorausging. Während das Tyrosin an Position 1 des Heptapeptids sowohl in Säugetieren als auch in der Hefe zu 100% in jeder CTD-Wiederholung zu finden ist, handelt es sich bei dem Serin an Position 7 um die am häufigsten abweichende Position in dem CTD-Heptamer. Nur in der Hälfte der menschlichen CTD-Wiederholungen taucht ein Serin in dieser Position auf und ist im distalen Teil der CTD häufig durch ein Lysin ausgetauscht. Man findet jedoch weder in der CTD-Sequenz von *S. pombe* noch in der von *S. cerevisiae* ein Lysin an dieser Position, weshalb das positive Signal des Antikörpers unerwartet war. Die Phosphorylierung von Tyrosin innerhalb der CTD wurde in Säugetieren hingegen schon *in vivo* dargestellt (Baskaran et al., 1993). Die ektopische Expression der c-Abl Tyrosinkinase erhöht dabei sowohl die Tyrosin-Phosphorylierung der endogenen Pol II und aktiviert die Expression von HIV-Templaten (Baskaran et al., 1997). Bisher konnte dieser Modifikation allerdings noch keine klare Funktion zugeordnet werden. Gleichmaßen wurde schon Threonin-Phosphorylierung innerhalb der CTD von Pol II entdeckt (Zhang und Corden, 1991), wobei auch in diesem Fall die funktionelle Bedeutung dieser Modifikation unklar ist. Da bei der Identifikation beider Phosphorylierungen bisher phosphorylierungsspezifische Pan-Antikörper verwendet wurden und sich insgesamt 15 Threoninreste an den Positionen 2, 5 oder 7 der Säugetier-CTD befinden, konnte bislang nicht eindeutig festgestellt werden, ob diese Threoninreste anstatt Threonin-4 das Ziel von Phosphorylierungen sind. Da in dieser Arbeit nun klar belegt werden konnte, dass wirklich Tyrosin-1 und Threonin-4 phosphoryliert werden und gleichzeitig die Phosphorylierung von Serin-7 neu entdeckt wurde, muss der CTD-Kode neu interpretiert werden. So sind nicht nur 4

verschiedene Phosphorylierungszustände einer CTD-Wiederholung möglich (unphosphoryliert, Ser2-P, Ser5-P, Ser2/5-P) sondern 32 ( $2^5$ ). Geht man nun gedanklich noch einen Schritt weiter und betrachtet die Kombinationsmöglichkeiten innerhalb einer CTD mit n Wiederholungseinheiten (n=26 in *S. cerevisiae*; n=52 *H. sapiens*), wären das  $32^n$  mögliche Phosphorylierungsmuster (Abb. 25).



**Abb. 25. Der erweiterte CTD-Kode.** Die Anzahl der möglichen Phosphorylierungszustände ist angedeutet. Zusätzlich könnte der Glykosylierungsstatus der Serinreste sowie des Threonins eine Rolle bei der Erkennung der CTD durch unterschiedliche Faktoren spielen. Da die funktionelle Einheit aus einem Di-Heptad besteht, wird die potenzielle Komplexität weiter erhöht (1024 Phosphorylierungszustände und 16 Prolin-Isomerisierungszustände), jedoch die Anzahl an potenziellen Bindestellen verringert. Obwohl der CTD-Kode durch 52 Wiederholungen bzw. 26 Di-Heptade ungeheuer komplex sein könnte, ist die Anzahl der Kombinationen durch die Rekrutierung verschiedener Modifikations-Enzyme beschränkt. Zudem werden manche Kombinationen einander positiv beeinflussen oder gänzlich ausschließen.

Das Genom des Menschen umfasst ca. 25000 Gene, die wiederum nur von einem Bruchteil der in der Zelle befindlichen ca. 300000 Pol II-Molekülen transkribiert werden (Kimura et al., 1999). Theoretisch besteht also die Möglichkeit, dass jedes einzelne Polymerase-Molekül in einer Zelle, unabhängig davon ob aktiv oder nicht, ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster in der CTD trägt. Es stellt sich also die Frage, ob jede individuelle CTD-Wiederholungseinheit in den Zellen eines Organismus unabhängig modifiziert wird. Berücksichtigt man die Ähnlichkeit der meisten Wiederholungen, scheint es unwahrscheinlich, dass Kinasen und Phosphatasen diese ausreichend unterscheiden können um die meisten Wiederholungen unabhängig zu modifizieren. Daher ist das Muster modifizierter CTD-Wiederholungen wahrscheinlich relativ einheitlich, je nachdem, welches Enzym gerade an die CTD rekrutiert wurde. Die durchgeführten Tandem-Immunpräzipitationen scheinen dies zu bestätigen (Abb. 9). Berücksichtigt man nämlich, dass sich die Reaktivität mancher CTD-spezifischer Antikörper ausschließt (z.B. Ser5-P und Thr4-P), und man gleichzeitig keinerlei Signal im Westernblot mit dem jeweils einen Antikörper gegen die IP des jeweils anderen bekommt, kann das nur bedeuten, dass sich alle, oder zumindest die deutliche Mehrheit der einzelnen CTD-Wiederholungen der präzipitierten Polymerasen in ihrem Modifikationsmuster gleichen. Zudem akkumulieren die Polymerasen in der SDS-PAGE hauptsächlich in 2 Formen, was zusätzlich dafür spricht, dass die Mehrheit der Polymerasen einer Zelle sich in wenige Populationen mit einem ähnlichen Modifikationsmuster unterteilt.

### **4.2 Verschiedene CTD-Modifikationen in Pol II-Populationen**

Die zwei Hauptformen, die unterschiedlich schnell in der SDS-PAGE wandern sind die Pol IIA-Form, in der die CTD wenig bis gar nicht phosphoryliert ist, und die langsamere IIO-Form, die eine hyperphosphorylierte CTD besitzt. Die hyperphosphorylierte Form der Säuger-CTD trägt durchschnittlich 1 Phosphat/Wiederholung (Payne und Dahmus, 1993), wobei die Anzahl der Phosphatgruppen der CTD zu einem bestimmten Zeitpunkt des Transkriptionszyklus noch nicht bestimmt wurde. Pol IIA assoziiert bevorzugt mit dem Prä-Initiationskomplex am Promotor und jedwede Phosphorylierung der CTD vor diesem Punkt verhindert die Rekrutierung und Initiation. Die Elongation des Transkripts wird



stattdessen von der stark-phosphorylierten I10-Form ausgeführt, was bedeutet, dass CTD-Phosphorylierung während des Transkriptionszyklus auftaucht. In der Literatur wurden zudem zwei weitere Pol II-Populationen beschrieben, die ebenfalls stark phosphorylierten Pol I100- und Pol I1M-Formen. Hierbei handelt es sich um Polymerasen, die nicht an das DNA-Templat gebunden sind und als transkriptionell inaktiv gelten (Palancade und Bensaude, 2003; Xu und Manley, 2004). In der Literatur herrscht die Meinung vor, dass die Hyper-Phosphorylierung die Ursache für den massiven Shift von I1A nach I10 ist (Palancade und Bensaude, 2003), die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen diese Einschätzung größtenteils. So führte die, teilweise massive, Reduktion der Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste unter Stressbedingungen zu keinerlei Reduktion der Pol I10-Form (Abb. 10-12). Dass der Phosphorylierungsgrad der CTD trotzdem einen, wahrscheinlich indirekten Einfluss, auf das unterschiedliche Laufverhalten der Pol II hat, belegt das Auftauchen der Pol I1M-Bande nach zellulärem Stress sowie der Hemmung bestimmter Kinasen (Abb. 11, 12 und 19). Nachdem auch die Glykosylierung von Threonin-4 als Ursache für den Shift ausgeschlossen werden konnte, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Isomerisierung der Proline an Position 3 und 6 der CTD-Heptade der Hauptgrund für dieses Phänomen sind. Die CTD-Phosphorylierung beeinflusst dabei wahrscheinlich v.a. indirekt die Konformation der Prolinreste. Unterschiedliche Phosphorylierungsmuster könnten einerseits eine bestimmte Stellung der Proline stabilisieren und andererseits könnten sie das Erkennungsmotiv für die verantwortlichen Isomerasen sein. Zudem ist es mir gelungen in verschiedenen Mausgeweben eine Laufform der Pol II (Pol I1X) zu identifizieren die in der SDS-PAGE deutlich schneller als die Pol I10-Form wandert, jedoch sämtliche CTD-Phosphorylierungen in vergleichbarer Menge trägt (Abb. 8). Während sich der Grad der einzelnen Phosphorylierungen in den jeweils gleichen Geweben kaum unterscheidet, weicht hingegen das Phosphorylierungsmuster in den verschiedenen Geweben teilweise deutlich voneinander ab. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die unterschiedlichen Anforderungen der Gewebe an die Expression bestimmter Gene über das CTD-Modifikationsmuster reguliert, oder zumindest feinabgestimmt werden könnten. Das Auftreten der neuen Polymeraseform Pol I1X könnte zudem bedeuten, dass in Organismen Polymerase-Modifikationen, und damit Transkriptions-Regulationsmechanismen, existieren, die unter den Laborbedingungen der Zellkultur nicht benötigt werden.

#### 4.2.1 Die Isomerisierung der CTD-Proline

Die zwei Peptidyl-Prolyl-Bindungen in jeder Konsensus-Wiederholung der CTD können sich entweder in *cis*- oder in *trans*-Stellung befinden, woraus sich vier mögliche Konfigurationen für jedes Heptapeptid der Säuger-CTD ergeben (Abb. 25). Mindestens ein Protein, das an der Erkennung der Poly(A)-Stellen beteiligt ist, bindet selektiv an Wiederholungen, deren Proline sich alle in der *trans*-Konformation befinden. Folgende Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) könnten *in vivo* an der Isomerisierung beteiligt sein. Sowohl das Säugerprotein Pin1 als auch das Hefeprotein Ess1 besitzen PPIase-Aktivität und sind aussichtsreiche Kandidaten für die Regulation der CTD-Struktur und ihrer Funktion durch Prolin-Isomerisierung (Xu und Manley, 2004). Beide interagieren mit der phosphorylierten CTD und zeigen eine ungewöhnliche Substratspezifität gegenüber Peptiden bei denen das Prolin auf ein Phosphoserin oder ein Phosphothreonin folgt. Mutationen in Ess1 sind mit Prä-mRNA-3'-Prozessierungsdefekten assoziiert, während es in Säugetieren keine Hinweise darauf gibt, dass Pin1 eine positive Rolle in der Polyadenylierung spielt. Bisher konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Bindung beliebiger Transkriptions- oder Prozessierungsfaktoren an die CTD durch enzymatische Prolin-Isomerisierung beeinflusst wird. Jedoch beeinträchtigt Pin1 den Phosphorylierungsstatus der CTD indem es die Phosphatase Fcp1 hemmt, was wiederum einen negativen Effekt auf die Transkription nach sich zieht (Xu und Manley, 2007). Im Gegensatz dazu führt eine Behandlung von Säugetier-Zellen mit dem Pin1-Inhibitor Juglone zu einem Verschwinden der Pol IIA-Form (Appendix Abb. A6). Die Gründe hierfür könnte entweder ein Shift in die Pol II0-Form oder ein Abbau der Pol IIA-Form sein. Da weder eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 den Effekt verhindert, noch eine parallele Behandlung mit dem Kinase-Hemmer DRB, konnte diese Frage nicht abschließend geklärt werden.

#### 4.2.2 Die RNA-Polymerase II ist ein Glykoprotein

Die CTD der Säugetiere kann auch durch den Anhang eines N-Acetylglucosamin-Monosaccharides (O-GlcNAc) an die Hydroxylgruppen der Serin- und Threoninreste

modifiziert werden (Kelly et al., 1993). Interessanterweise konnte bisher keinerlei Glykosylierung an den phosphorylierten Formen von Pol II CTD nachgewiesen werden, was bedeuten könnte, dass Glykosylierung und Phosphorylierung einander ausschließen. Es wäre denkbar, dass die glykosylierte Form von Pol II an den Promotor rekrutiert wird und eine N-Acetylglucosaminase in dieser Phase die O-GlcNAc-Gruppe selektiv entfernt bevor die Phosphorylierung erfolgt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, dass der niedrige Level an Glykosylierung, der nachgewiesen wurde, eine Rolle in der Expression von Genen spielt. Im Rahmen dieser Arbeit ist es mir gelungen, die Existenz der CTD-Threonin-4-Glykosylierung nachzuweisen. Zumindest diese Modifikation erscheint in den gleichen Pol II-Populationen (Pol II0 und IIX) wie die CTD-Phosphorylierungen und ist artenübergreifend konserviert. Dennoch bleibt natürlich unbestritten, dass eine Glykosylierung einer bestimmten Aminosäure deren gleichzeitige Phosphorylierung verhindert. Ob diese Art der Modifikation darüber hinaus eine Funktion während der Pol II-Transkription erfüllt, und damit den CTD-Kode funktionell erweitert, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

### **4.3 Die Rolle der neuen CTD-Phosphorylierungen**

Nach der Identifikation der neuen Phosphorylierungsstellen Threonin-4 und Serin-7 stellte sich natürlich die Frage, ob diese beiden Modifikationsstellen einen ähnlichen Einfluss auf die Regulation der allgemeinen Transkription haben wie die benachbarten Aminosäurereste Serin-2 und -5, oder ob sie spezifischere Funktionen bei der Kontrolle der Expression von bestimmten Genen haben. Während der Fokus dieser Arbeit hauptsächlich auf der Untersuchung der Serin-7-Phosphorylierung lag, ist es Corinna Hintermair aus unserer Arbeitsgruppe gelungen nachzuweisen, dass die Phosphorylierung von Threonin-4 Zellzyklus-abhängig auftaucht und die Threonin-4-phosphorylierte Polymerasen dabei überraschenderweise in der Mitose mit den Zentrosomen assoziieren (Hintermair et al., Publikation in Vorbereitung).

Nachdem es mir gelungen ist, die Phosphorylierung von Serin-7 *in vivo* in Säugerzellen sowie in der Hefe nachzuweisen stellte sich die Frage, ob die Polymerase diese Markierung während der Transkription trägt, oder ob sie ein Zeichen für inaktive Polymerasen darstellt. In Chromatin-Immunpräzipitationen folgt die Verteilung von Serin-7-phosphorylierte Pol II der Verteilung von Phosphoserin-5

und befindet sich in den Promotor-nahen Regionen aktiver Gene (Akhtar, Heidemann et al., 2009; Glover-Cutter et al., 2009). Sylvain Egloff und der Arbeitsgruppe um Shona Murphy ist es in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe gelungen eine Funktion der CTD-Serin-7-Phosphorylierung herauszufinden. Während diese Modifikation auch an proteinkodierenden Genen nachgewiesen wurde, ist sie wichtig für die Prozessierung von zwei snRNAs des Spleißosoms, die ebenfalls von Pol II transkribiert werden. Ersetzt man in der Zellkultur das Serin an Position 7 der CTD-Konsensus-Wiederholung durch ein Alanin und verhindert dadurch die Phosphorylierung dieser Position, hat dies kaum Einfluss auf die Expression von endogenen oder transient-transfizierten proteinkodierenden Genen (Chapman et al., 2007). Im Gegensatz dazu bewirkt der Austausch von Serin-7 zu Alanin jedoch einen deutlichen Defekt in der Transkription menschlicher snRNA-Gene und in der Bildung der 3'-Enden dieser Transkripte (Egloff et al., 2007), was darauf hindeutet, dass mindestens ein Element des CTD-Kodes auf genspezifische Art und Weise gelesen werden kann. So ist die Serin-7-Phosphorylierung der CTD nötig für eine stabile Interaktion des Integratorkomplexes mit der transkribierenden Pol II. Der Integratorkomplex besteht aus mehreren Untereinheiten und spielt eine tragende Rolle bei der 3'-Prozessierung von snRNAs, ist aber an der Prozessierung von Transkripten proteinkodierender Gene nicht beteiligt (Baillat et al., 2005). Demnach ist der Integratorkomplex, und infolgedessen möglicherweise auch die Phosphorylierung von Serin-7, funktionell auf die Expression einer bestimmten Genklasse beschränkt. Aufgrund dieser genspezifischen Rolle der Phosphoserin-7-Markierung stellt sich natürlich die Frage, ob die zuständige Kinase ausschließlich zu nichtkodierenden snRNA Genen rekrutiert wird.

Im Gegensatz zu aktuelleren Studien, zeigten erste Untersuchungen der Phosphoserin-7-Verteilung auf Protein-kodierenden Genen mittels Chromatin-Immunpräzipitation eine Anreicherung dieses Signals innerhalb der transkribierten Bereiche (Chapman et al., 2007). Das könnte bedeuten, dass die Serin-7-Kinase mit der elongierenden Pol II assoziiert und die Polymerase für die Bindung mit der 3'-Prozessierungsmaschinerie der snRNA vorbereitet. Die Identifizierung der Serin-7-Kinase sollte daher Aufschluss über die Mechanismen geben, die der Rolle der CTD zur Abstimmung verschiedener Prozesse während der Transkription unterliegen.

#### 4.4 CDK7/Kin28 ist eine CTD-Serin-7-Kinase

Die Identifikation der TFIIH-assoziierten Kinase Kin28 als eine CTD-Serin-7-Kinase war aus mehreren Gründen unerwartet. Zum Einen gehört sie der Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen an, die ein Serin-Prolin-Dipeptid als Substrat bevorzugen, während Serin-7 von einem Tyrosin-Rest flankiert wird (Songyang et al., 1996). Zweitens assoziiert Kin28 und das menschliche Homolog CDK7 mit der RNA-Polymerase II an Gen-Promotoren und nicht tief in den transkribierten Bereichen, wo eine Anreicherung der Serin-7-Phosphorylierung ursprünglich festgestellt wurde. Und drittens assoziiert diese Kinase mit den meisten, wenn nicht gar mit allen Pol II-transkribierten Genen und es ist nicht bekannt, dass sie eine bestimmte Rolle in der Expression von snRNA-Genen spielt. Im Gegenteil, biochemische Analysen deuten darauf hin, dass TFIIH weder mit Pol II, noch mit anderen Bestandteilen der Transkriptions-Maschinerie an snRNA-Promotoren assoziiert (Hernandez, 2001). Zu guter Letzt ist Kin28/CDK7 dafür bekannt, spezifisch die Serin-5-Reste der CTD zu phosphorylieren und zeigt *in vivo* keine hohe Aktivität gegenüber den benachbarten Serin-2-Resten. Im Gegensatz zu diesen Erwartungen zeigen die erhobenen Daten in dieser Arbeit, dass TFIIH *in vivo* die Serin-7-Phosphorylierungen nahe der Promotoren Pol II-transkribierter Gene anbringt und an der Transkription von snRNA-Genen beteiligt ist (Abb. 23). Dies könnte bedeuten, dass die Serin-7-Phosphorylierung zu der Rekrutierung des Integrator-Komplexes bzw. seines funktionellen Analog in der Bäckerhefe an die snRNA-Genpromotoren führt. Diese Rekrutierung hängt nicht allein von der Serin-7-Phosphorylierung ab, sondern auch von den Promotor-Elementen und dem speziellen Prä-Initiations-Komplex, der an diese Elemente bindet. Nach der Ablösung vom Promotor wandert der RNA-Prozessierungs-Komplex mit der elongierenden Pol II und assoziiert mit dem naszierenden Transkript, sobald die 3'-Ende-Box am Ende der snRNA-Transkriptionseinheit erreicht wird, wodurch dann die kotranskriptionelle Prozessierung der RNA stattfinden kann. Bei Protein-kodierenden Genen ermöglichen Promotor-gebundene Faktoren die Bindung des CPSF-Komplexes (*Cleavage and polyadenylation specificity factor*) (Glover-Cutter et al., 2008) oder des Nrd1-Komplexes mit der Pol II (Vasiljeva et al., 2008; Gudipati et al., 2008). Jeder dieser Komplexe, der Integrator, Nrd1 oder CPSF antwortet auf verschiedene Prozessierungssignale innerhalb des naszierenden Transkripts.

Die erhobenen Daten belegen, dass die TFIIH-assoziierte Kinase in der Hefe während der frühen Phasen der Gen-Transkription bivalente Phosphoserin-5- und Phosphoserin-7-Markierungen an die Pol II-CTD anbringt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese bivalente Markierung, und nicht die Serin-5-Phosphorylierung alleine, von Bur1 oder der CDK9-Untereinheit von P-TEFb erkannt wird, und so diesen Enzyme in der Folge ermöglicht, die CTD und andere Faktoren zu modifizieren (Viladevall et al., 2009; Qiu et al., 2009). Die Erkenntnisse bezüglich der Serin-7-Kinase, die in dieser Arbeit sowohl *in vivo* in der Hefe *S. cerevisiae* als auch *in vitro* mit aufgereinigten Säugetierkinasen gewonnen wurden, deuten ganz klar darauf hin, dass auch in höheren Eukaryoten CDK7 für die Promotor-nahe CTD-Serin-7-Phosphorylierung zuständig sein könnte. Diese Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe um David Bentley bestätigt, der es mit Hilfe unseres Phosphoserin-7-Antikörpers und einer konstruierten ATP-Analog-sensitiven CDK7 gelungen ist, nachzuweisen, dass auch in Säugetieren TFIIH/CDK7 die CTD von Pol II *in vivo* an Serin-7 phosphoryliert (Glover-Cutter et al., 2009). Da die Verteilung der Serin-7-Phosphorylierung in ChIP-Experimenten weder in *S. cerevisiae* noch in Metazoen auf snRNA-Gene beschränkt ist, sondern universell vorkommt, wäre es gut möglich, dass über diese Komponente des CTD-Kodes Informationen vermittelt werden um bestimmte Protein-Komplexe zu rekrutieren, die verschiedene Klassen von Transkripte prozessieren. Interessanterweise ähnelt das Muster der Serin-7-Phosphorylierung in ChIP-Experimenten dem der Serin-5-Phosphorylierung in den meisten Fällen sehr stark und zeigt oft einen nahezu identischen Verlauf (Akhtar, Heidemann et al., 2009; Glover-Cutter et al., 2009). Die Analyse der CTD-Mutanten zeigte zudem, dass die Phosphorylierung von Serin-7 direkt von der Serin-5-Phosphorylierung abhängen könnte, da der Austausch von Serin-5 zu Alanin eine Phosphorylierung von Serin-7 verhindert, während umgekehrt die Serin-5-Phosphorylierung unabhängig von der Position 7 der CTD-Konsensus-Wiederholung zu sein scheint. Diese artenübergreifenden Korrelationen von CTD-Modifikationsmustern legen natürlich eine weiterführende Funktion der Serin-7-Phosphorylierung nahe. Obwohl in Säugetieren besonders im distalen Bereich der CTD häufig das Serin an Position 7 des Heptads durch eine andere Aminosäure ausgetauscht ist, ist diese Aminosäure im proximalen Teil der Säugetier-CTD bis in niedrigere Eukaryoten wie der Hefe stark konserviert, was ebenfalls für eine wichtige Rolle dieser Phosphorylierungsstelle spricht.

## 4.5 Die Bedeutung der Heptad-Sequenz

Die repetitive Beschaffenheit der CTD deutet darauf hin, dass diese Struktur eine steigende Anzahl an Interaktionsmöglichkeiten für CTD-bindende Proteine bereit stellt. Trotz der starken Konservierung des Konsensus-Motivs  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$  über die Artengrenzen hinweg, herrscht unterschiedlicher funktioneller Bedarf an bestimmten Aminosäureresten. So wird in der Hefe die Einführung von rekombinanten Polymerasen toleriert, deren CTD aus bestimmten Nicht-Konsensus-Wiederholungen zusammengestellt ist, während dies in Säugetierzellen lethal ist. Zudem kann die CTD von *M. invertans* die kanonische CTD von *S. cerevisiae* funktionell ersetzen, obwohl sämtliche Threonin-4- und Serin-7-Reste in allen 25 Heptaden dieser CTD durch ein Alanin ausgetauscht sind (Stiller et al., 2004). Gleichzeitig ist es möglich die CTD der Hefe durch ihr größeres Gegenstück aus den Säugetieren zu ersetzen und die volle Funktionalität zu erhalten (Allison et al., 1988), während der Austausch der Säugetier-CTD in eine reine Konsensus-CTD der gleichen Länge die Zell-Viabilität reduziert (Chapman et al., 2005). Im Gegensatz zu diesen Studien zeigen die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit deutlich, dass Säugetierzellen mit einer rekombinanten Pol II eine fast identische Viabilität aufweisen, unabhängig davon, ob die Sequenz der Wildtyp-CTD entspricht oder fast nur aus Konsensus-Wiederholungen zusammengesetzt ist (Abb. 13). Da die Nicht-Konsensus-Wiederholungen der CTD innerhalb der Säugetiere zu 100% konserviert sind, könnten sie aber für Ereignisse, wie Reaktionen auf zellulären Stress, benötigt werden, die unter den optimalen Bedingungen der Zellkultur gar nicht stattfinden. Da neben der Serin-5- auch die Serin-7-Phosphorylierung unter verschiedenen Stressbedingungen konstant bleiben, während sich die Serin-2-Phosphorylierung deutlich verändert (Abb. 10-12; Munoz et al., 2009), könnte hier eine weitere Funktion dieser neuen Modifikation liegen. So wäre es durchaus möglich, dass über bestimmte Kombinationen innerhalb des CTD-Modifikationsmuster eine spezifische Genexpression zur Stressantwort gesteuert wird. Der unterschiedliche Bedarf an den einzelnen Aminosäureresten in Konsensus- wie Nicht-Konsensus-Wiederholungen könnte ebenfalls eine weitere Ebene der Regulation widerspiegeln. So wäre es denkbar, dass nicht-phosphorylierbare Aminosäuren eine andere Art der Modifikation und der Signalgebung, wie z.B. durch eine etwaige Methylierung bzw. Acetylierung

der Lysinreste an Position 7 der distalen CTD-Wiederholungen in Säugetieren, gewährleisten. Natürlich könnten diese Aminosäuren auch schlichtweg den Phosphorylierungsgrad einer solchen CTD-Wiederholung einschränken (Chapman et al., 2007). Säugetierzellen mit Rpb1-Mutationen, die entweder gar keine oder eine CTD besitzen, die nur aus bestimmten Nicht-Konsensus-Wiederholungen zusammengesetzt sind, können zwar an den Promotor binden, haben dann aber Schwierigkeiten bei den nachfolgenden Schritten der Transkriptions-Elongation (Chapman et al., 2007; Meininghaus et al., 2000; Lux et al., 2005). Hier herrscht jedoch ein großer Unterschied, je nachdem welcher Aminosäurerest der Konsensus-Sequenz ausgetauscht wird. So sterben Zellen mit rekombinanten Polymerasen sehr schnell, wenn diese kein Serin-2, Serin-5 oder Threonin-4 besitzen, während Zellen mit einem Alanin anstatt eines Serins an Position 7 des Heptads „nur“ die Proliferation einstellen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bestimmte Nicht-Konsensus-Sequenzen eine Bindung von initiiierenden Komplexen, wie den Mediator, erschweren könnten und dadurch die Gelegenheit einer erfolgreichen Initiation reduzieren. Da den Nicht-Konsensus-Heptaden bestimmte modifizierbare Aminosäurereste fehlen, könnten sie auch schlechtere Substrate für CTD-modifizierende Enzyme darstellen, die ansonsten die benachbarten Aminosäurereste bearbeiten würden (Liu et al., 2008; Chapman et al., 2007; Lux et al., 2005). Zudem könnten die Nicht-Konsensus-Wiederholungen Andockstellen für Proteine sein, die Spezies-spezifischere Aufgaben erfüllen.

### **4.5.1 Die Bedeutung der CTD-Länge**

Neben der Aminosäuresequenz der einzelnen CTD-Heptade unterscheidet sich diese Domäne in den unterschiedlichen Spezies auch in ihrer Länge bzw. in der Anzahl ihrer Wiederholungen (Chapman et al., 2008). Es existieren Studien, die belegen, dass vielmehr die CTD-Länge, und nicht ihre genaue Sequenz, die Funktion der CTD bestimmt. So hängt bei der 3'-Prozessierung der Prä-mRNA die Spaltungsaktivität hauptsächlich von der Anzahl der CTD-Wiederholungen ab, während dieser Vorgang in Säugetierzellen mit einer Wildtyp-CTD nur wenig effizienter vonstatten ging als in Zellen mit einer CTD, die ausschließlich Konsensus-Wiederholungen enthielt (Ryan et al., 2002). In Säugetieren scheint die Länge der CTD wichtig für Differenzierungs-spezifische alternative Spleiß-Vorgänge zu sein,



wie die Hemmung der Aufnahme des schwachen EDI (Fibronectin Extradomäne I)-Exons (de la Mata und Kornblihtt, 2006). In anderen Experimenten wurde beobachtet, dass Säugetierzellen mit 31 CTD-Wiederholungen fähig zur Transkription, Spleißen, Spaltung und Polyadenylierung sind, jedoch Defekte beim Transport der reifen mRNA zeigen, was darauf hindeutet, dass die fehlenden CTD-Wiederholungen verantwortlich für die Bindung von Proteinen sind, die für diese Funktion benötigt werden (Custodio et al., 2007). Diese Daten belegen, dass die Anforderungen an die Länge der CTD von dem jeweiligen Protein abhängen, mit dem die CTD interagiert. So werden in Säugetierzellen ca. 20 Wiederholungen für korrektes Spleißen sowie für die Spaltung des 3'-Endes gebraucht (de la Mata und Kornblihtt, 2006; Rosonina und Blencowe, 2004), was mit dem Ergebnis übereinstimmt, dass mindestens 16 CTD-Wiederholungen von Nöten sind, damit die Pol II ihre eigene Expression unterstützen kann (Abb. 16; Chapman et al., 2007). Gleichzeitig treten ab der Länge von 16 Wiederholungen schon CTD-Phosphoserin-2- und -5 auf, während die Threonin-4- und Serin-7-Phosphorylierung einer längeren CTD bedürfen. Interessanterweise liegt die Anzahl der CTD-Wiederholungen, die für eine Proliferationsrate gleich der Wildtyp-Pol II benötigt werden ebenfalls zwischen 24 und 35 Wiederholungen (Abb. 15), was auch der CTD-Länge entspricht ab der die Threonin-4- und Serin-7-Phosphorylierung stattfindet (Abb. 16). Eine bestimmte Länge der CTD könnte also notwendig sein, um eine optimale Andockstelle für CTD-Kinasen sowie CTD- und Phospho-CTD-assoziiierende Faktoren zu erhalten, die unterschiedliche Formen dieser Faktoren aufnehmen kann. Auch hier muss man unterscheiden zwischen Protein-Komplexen mit essenzieller Funktion, die die Mindestanzahl an CTD-Wiederholungen bestimmen (das essenzielle Gerüst) und CTD-Wiederholungen, die über die Mindestlänge hinausgehen. Diese bieten Raum für die Bindung von Proteinen die an zusätzlichen oder ergänzenden Funktionen beteiligt sind, die unter den normalen Wachstumsbedingungen in der Zellkultur nicht benötigt werden. Die Interpretation, dass die Anforderungen an das „essenzielle Gerüst“ die minimale CTD-Länge festlegen, stimmt mit der Analyse der CTD-Längen-Mutanten überein. So zeigte eine Verkürzung der CTD auf 10 Wiederholungen in der Hefe eingeschränktes Wachstum, hatte aber kaum einen Einfluss auf die Rekrutierung basaler Transkriptionsfaktoren an die Promotorbereiche oder auf die Produktion reifer Transkripte konstitutiv-exprimierter Gene (West und Corden, 1995; Ahn et al., 2004). Studien mit CTD-mutierten Hefestämmen zeigen, dass Zellen mit

verkürzter CTD empfindlicher gegenüber Temperaturänderungen reagieren (West und Corden, 1995). Offenbar sind für Hilfsfunktionen, die für das Überleben der Zelle unter Stressbedingungen benötigt werden, zusätzliche CTD-Wiederholungen erforderlich.

### 4.5.2 Funktionelle Strukturen innerhalb der CTD-Wiederholungen

Diese Beobachtungen könnten bedeuten, dass die CTD-Länge insgesamt durch Ereignisse festgelegt wird, die Interaktionen von der größtmögliche Anzahl an Phospho-CTD-assoziiierenden Proteinen benötigen. Diese Ereignisse beinhalten möglicherweise Antworten auf externe Stress-Signale, oder Differenzierungssignale während der Entwicklung. Mit ihrer natürlichen Länge kann die CTD alle erforderlichen Bindungsfaktoren aufnehmen und diese optimal anordnen. Dabei nutzen Faktoren hauptsächlich die proximalen CTD-Bindestellen, die für die Transkription unter normalen Bedingungen benötigt werden. Während der Zelldifferenzierung oder unter Stress-Bedingungen könnten dann Hilfsfaktoren größtenteils im distalen Bereich der CTD binden. Damit wären die spezifischen und/oder relativen Positionen der CTD-Bindestellen der Schlüssel zur Funktionalität der CTD. Das würde bedeuten, dass die Bindung vieler CTD-assoziiierender Proteine streng reguliert ist und sowohl Veränderungen in der Sequenz wie in der Länge der CTD einzelne dieser Bindungen aber auch die gesamte Organisation der assoziiierenden Faktoren beeinträchtigen können. So wurden Daten erhoben, dass verschiedene Faktoren, die unterschiedliche Funktionen ausfüllen verschiedene CTD-Regionen als Ziel bevorzugen könnten. So bindet das Spt6-Protein der Säugetiere *in vitro* selektiv die proximalen Konsensus-Wiederholungen (Yoh et al., 2008). Außerdem geht in Säugetierzellen selektiv ein RNA-Prozessierungs-Ereignis verloren, sobald bestimmte CTD-Wiederholungen von Rpb1 deletiert werden (Custodio et al., 2007).

Konservierte Hauptmerkmale der Pol II-CTD, sind die kanonische Heptapeptid-Sequenz in einer Tandem-artig wiederholten Struktur, sowie die Länge der CTD samt Sequenzabweichungen bei verwandten Spezies. Das Konsensus-Wiederholung-Motiv, das durch die Selektion begünstigt wurde ist bemerkenswert anpassungsfähig. In jeder CTD-Wiederholung können Tyrosin-1, Serin-2, Threonin-4, Serin-5 und Serin-7 phosphoryliert werden und Prolin-3 und -6 ihre Struktur zwischen *cis*- und

*trans*-Konformation wechseln. Durch all diese Veränderungen bleibt diese spezielle Zusammenstellung von Aminosäuren relativ flexibel und bietet damit eine enorme Bandbreite an potenziellen Bindestellen für Transkriptions- und Prozessierungsfaktoren und andere Faktoren (Sudol et al., 2001). Daher kann man davon ausgehen, dass sich diese spezielle Sequenz des kanonischen Heptapeptids entwickelt hat, weil dadurch eine effiziente und modifizierbare Regulation optimiert wurde. So ist die Struktur der CTD in unphosphoryliertem Zustand weitestgehend ungeordnet, während sie eine Vielzahl von induzierbaren Strukturen ermöglicht, sobald sie modifiziert wird (Meinhart et al., 2005; Zhang und Corden, 1991). Vollbeladen mit unterschiedlichen Proteinen jedoch ist die CTD größeren regionalen und globalen Zwängen unterworfen. So können die proximalen und distalen Wiederholungseinheiten ihre funktionelle Gleichwertigkeit verlieren, sobald Faktoren in der Nähe eines bestimmten Heptapeptid-Paares binden (Custodio et al., 2006). Deshalb kann diese einfache Zusammenstellung identischer Wiederholungen durch Zeit- und Positions-abhängige Modifikationen angepasst werden, um unterschiedliche und hoch spezifische Interaktionen zu ermöglichen. Obwohl meistens von dem Konsensus-Motiv und CTD-Heptad-Wiederholungen die Rede ist, wurden vielmehr Di-Heptade als funktionelle Einheit ausgemacht. So sind Hefestämme überlebensfähig, deren CTD aus multiplen Zweier-Heptaden zusammengestellt sind, auch wenn diese jeweils von eingeführten Abstandhaltern, meist Alanin-Reste, getrennt werden. Hefen, bei denen die Abstandhalter nach jeweils nur einer Konsensus-Wiederholung eingeführt wurden sind hingegen nicht lebensfähig (Stiller, 2004). Aktuellere Studien belegen, dass nicht zwei vollständige Heptade, sondern die Sequenz  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6X_7Y_8$  zusammen mit einem vorangehenden  $S_2PXS_5PX$ - oder einem nachfolgenden  $S_2P$ -Motiv, die funktionelle Einheit bilden (Liu et al., 2008). Die Tatsache, dass zwei kanonische Tandem-Heptapeptide benötigt werden um eine funktionelle Einheit zu bilden, könnte die Konservierung des globalen Tandem-Struktur ebenso begünstigen. Dennoch wird das Einfügen einer strukturell flexiblen Sequenz zwischen die essenziellen Einheiten einigermaßen gut toleriert. Nichtsdestotrotz scheint eine globale Tandem-Struktur die Funktion der CTD auf verschiedene Weisen zu optimieren, zumindest in den stark konservierten, kanonischen Regionen, wo zahlreiche Proteine mit Kern-Funktionen untergebracht werden müssen. Möglicherweise verändert sich dabei die Anordnung der Faktoren, je nachdem welche Gene exprimiert werden.

Diese Tandem-Struktur stellt sicher, dass jedes YSPTSPS-Motiv Bestandteil einer funktionellen CTD-Einheit ist und maximiert die Flexibilität der Lage-abhängigen Bindung dieser Motive durch verschiedene Protein-Faktoren. Da die funktionellen Einheiten überlappen, ermöglicht eine Tandem-artig wiederholte Struktur die größtmögliche Anzahl und gleichzeitig die dichteste Verteilung an Bindestellen entlang der gesamten CTD-Länge. Das wiederum erlaubt die effizienteste Positionierung von verschiedenen Proteinen mit Rücksicht aufeinander. Die Kern-Faktoren, die sich entwickelt haben um mit den kanonischen essenziellen Einheiten zu interagieren, können die Kontext-abhängige Bindung am effizientesten ausnutzen, indem sich die Bindestellen über die gesamte Länge der CTD erstrecken. Daher könnte für die meisten mutierten CTDs gelten, dass Proteine an suboptimale Positionen binden, obwohl sie eine ausreichende Anzahl an Kern-Einheiten besitzen um essenziellen CTD-Protein-Interaktionen Platz zu bieten. Darüber hinaus resultiert eine Tandem-Anordnung in einer ungeordneten Struktur entlang der gesamten CTD, da jede einzelne CTD-Wiederholung von sich aus unstrukturiert ist. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die repetitive Struktur der CTD unter einem starken Selektionsdruck steht, damit sie innerhalb und um jede essenzielle Wiederholungseinheit stabil in ungefaltetem Zustand bleibt.

### **4.6 Der CTD-Modifikationsstatus reguliert Wechselwirkungen mit dem DNA-Templat**

Die Anwesenheit der CTD-Heptapeptide in so unterschiedlichen Organismen wie Amöben, Plasmodien, Hefen und Säugetieren weist darauf hin, dass diese Sequenz eine Wechselwirkung mit einer alten und hochkonservierten Struktur ermöglichen könnte. Es wurde bereits in vergangenen Studien gezeigt, dass die CTD an DNA binden kann (Suzuki, 1990) und dort möglicherweise negative regulatorische Elemente verdrängt, wodurch wiederum Interaktionen zwischen Aktivatoren und Transkriptionsfaktoren in den Promoter-Bereichen zugelassen werden könnten. *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass die CTD doppelsträngige, aber keine einzelsträngige, DNA in einer unspezifischen, DNA-Sequenz-unabhängigen Weise bindet (Suzuki, 1990; Peterson et al., 1991). Dabei wurde beobachtet, dass die CTD-Phosphorylierung durch CDK7 diese Bindung komplett aufhebt, während Phosphorylierung durch CDK9 die Bindung stark verringert (Lolli et al., 2009). Im

CTD/DNA-Komplex befindet sich Serin-2 sehr nah am Rückgrat der DNA und die Addition einer Phosphatgruppe an diesen Aminosäurerest ist nicht mit einer DNA-Bindung vereinbar. Die Konformation der DNA-gebundenen CTD ist auf das Serin-5 zentriert und eine Phosphorylierung an dieser Position würde den Erhalt einer solch kompakten Struktur erschweren. Lolli et al. haben gezeigt, dass die Präferenz für die vorausgehende Phosphorylierung durch CDK7 an der Verfügbarkeit von Serin-5 liegt, da dieses im CTD/DNA-Komplex zur löslichen Phase hin exponiert wird, während Serin-2 verdeckt und somit unzugänglich ist. In der Abwesenheit von DNA findet die Phosphorylierung von Serin-2 durch CDK9 mit der gleichen Effizienz statt, unabhängig davon ob Serin-5 phosphoryliert wird oder nicht. Die Phosphorylierung von Serin-5 durch CDK7 hat zur Folge, dass die CTD nicht länger DNA binden kann und folglich Serin-2 für eine Phosphorylierung durch CDK9 zugänglich macht. In diesem CTD/DNA-Modell liegt Serin-7 ebenfalls verdeckt und der Zugang zu dieser Aminosäure wäre nicht mit einer Bindung der CTD an DNA zu vereinbaren. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Serin-7-Phosphorylierung an Polymerasen angereichert ist, die sich Richtung Ende des Genes bewegen und an der 3'-Prozessierung von bestimmten Transkripten beteiligt ist (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). CTD-Tyrosin-1 kann durch die Kinase c-Abl phosphoryliert werden (Baskaran et al., 1999), obwohl dieser Modifikation bisher noch keinerlei Funktion zugeordnet werden konnte. In dem vorgeschlagenen CTD-DNA-Modell interkaliert Tyrosin-1 zwischen die Basenpaare der DNA und ist für eine Phosphorylierung nicht zugänglich, während Threonin-4 zumindest teilweise exponiert vorliegt. CDK7 und CDK9 haben eine unterschiedlich ausgeprägte Neigung bezüglich der Phosphorylierung verschiedener CTD-Wiederholungen. Dabei phosphoryliert CDK7 die proximalen CTD-Wiederholungen, die zum größten Teil der Konsensus-Sequenz folgen, genauso gut wie die distalen, die häufig vom Konsensus-Motiv abweichen. CDK9 hingegen bevorzugt deutlich die Konsensus-Wiederholungen und zeigt gegenüber den distalen CTD-Wiederholungen nur eine schwache Aktivität (Ramanathan et al., 2001; Pinhero et al., 2004). Die durch CDK9 Serin-2-phosphorylierte CTD besitzt demnach einige unphosphorylierte Wiederholungen die immer noch an DNA binden können, während CDK7 die gesamten Serin-5-Reste der CTD phosphorylieren kann und dadurch eine CTD-DNA-Bindung komplett verhindert. Dies kann man der kompakten Konformation zuschreiben, die für eine DNA-Bindung benötigt wird und hauptsächlich durch die

Konformation von Prolin-6 sowie der Tyrosin-1-Interkalation bestimmt wird. In dieser Konformation kann Serin-5 keine Phosphatgruppe aufnehmen, da diese das Gegenteil bewirken und die CTD zu einer Veränderung der Konformation zwingen würde. Andererseits stellt der CTD/DNA-Komplex ein wesentlich besseres Substrat für CDK7 dar, als die freie CTD. Das Modell des CDK7/CyclinH/CTD/DNA-Komplexes weist daraufhin, dass die Erkennung der DNA durch eine Schleifen-Struktur innerhalb von CDK7 selbst erreicht werden könnte. Diese Domäne ist in CDK7 im Vergleich zu anderen CDKs länger und basischer und gibt dem CTD/DNA-Komplex die richtige Orientierung vor, um Serin-5 in das aktive Zentrum von CDK7 zu dirigieren. Diese Interpretation wird von den Daten aus Mutagenese-Experimenten unterstützt. Wenn sie an DNA gebunden vorliegt, wird die Phosphorylierung der CTD durch CDK9 deutlich verringert. Im CTD/DNA-Komplex ist Serin-2 kaum zugänglich, weshalb CDK9 nicht fähig sein sollte Serin-2 zu phosphorylieren. Während der Prä-Initiationsphase bindet die CTD die DNA, sowie einige Transkriptionsfaktoren (Douziech et al., 1999). Diese Interaktionen verbergen die CTD vor der CDK9 durch sterische Behinderung und/oder elektrostatische Abstoßungskräfte. Erst, nachdem diese Interaktionen von der CTD-Phosphorylierung durch CDK7 entfernt wurden, bekommt CDK9 eine Zugangsmöglichkeit. Somit macht CDK7 die CTD nicht zu einem besseren Substrat für CDK9, sondern bewirkt vielmehr, dass die CTD allgemein für weitere Modifikationen verfügbar gemacht wird. Nach der Initiation pausiert die Transkription bevor sie in die Elongationsphase eintritt. Diese Unterbrechung wird für das RNA-Capping benötigt und könnte einer verzögerten CTD-Phosphorylierung durch CDK9 zugeschrieben werden. Die anfängliche Phosphorylierung durch CDK9 ist nämlich ein langsamer Prozess, während die darauffolgende Addition von Phosphatgruppen wesentlich schneller vorangeht (Pinhero et al., 2004; Marshall et al., 1996). Obwohl die DNA/CTD-Interaktionen bisher nur *in vitro* nachgewiesen wurden, könnte dies der Grund für die Konservierung der CTD-Heptad-Struktur sein, da diese sich genau in die der DNA-Doppelhelix einpassen könnte. Ob diese beiden stark negativ-geladenen Moleküle *in vivo* aber tatsächlich direkt miteinander interagieren wird weiterhin kontrovers diskutiert (Matthias Geyer, persönliche Kommunikation). Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die CTD zumindest eine Andockstelle für DNA-modifizierende Enzyme bieten könnte und somit indirekt mit dem Templat wechselwirkt (Perales und Bentley, 2009). Einer der ersten kotranskriptionellen Prozessen der in Eukaryoten

identifiziert wurde ist die Transkriptions-gekoppelte DNA-Reparatur. Dabei bleibt die Transkriptions-Maschinerie an einer DNA-Läsion stehen und rekrutiert die Nukleotid-Excisions-Reparatur-Maschinerie (NER). Somit könnte die Pol II selbst das spezifischste Erkennungs-Protein für DNA-Schäden darstellen (Lindsey-Boltz und Sancar, 2007). Eine andere Modifikation der DNA, die wahrscheinlich durch den Transkriptions-Elongationskomplex geleitet wird, ist die somatische Hypermuation von Immunglobulin-Genen durch die Deaminierung von Cytosinbasen im verlagerten Nicht-Templatstrang der transkribierten DNA. Diese Reaktion wird durch die Aktivierungs-induzierten Deaminase AID katalysiert, welche wahrscheinlich mit der Pol II assoziiert (Nambu et al., 2003).

#### **4.7 Der CTD-Kode trifft den Histon-Kode**

Der Pol II-Elongationskomplex ist das Ziel von verschiedenen Proteinen die das Chromatin-Templat modifizieren. Die kovalente Modifikation der Histone steuert die Beschaffenheit des Chromatins und ist essenziell für die fehlerfreie Regulation der Transkription (Berger, 2007). Dabei ist die Trimethylierung des Lysin-4 von Histon H3 (H3K4me3) mit aktiven Genpromotoren verbunden, während die Histon H2B Monoubiquitinylierung (H2Bub1) in den transkribierten Regionen aktiver Gene gefunden wird (Berger, 2007; Weake und Workman, 2008). Die Genomweite Untersuchung der Histon-Modifikationen brachte intensive, wechselseitige Beziehungen zwischen den Chromatin-Modifikationen und der Transkriptions-Maschinerie ans Licht, was darauf hindeutet, dass die Regulation der Genexpression weitaus komplexer sein könnte als zunächst angenommen wurde (Egloff und Murphy, 2008; Suganuma und Workman, 2008). Die Modifikation der N-terminalen Histonschwänze hat erheblichen Einfluss auf die Beschaffenheit des Chromatins und die fehlerfreie Platzierung dieser kovalenten Markierungen ist für viele Prozesse des Zellkerns entscheidend. Obwohl mehrere Chromatin-Modifikationen identifiziert und mit Prozessen wie der Transkription und der DNA-Replikation in Verbindung gebracht wurden, ist die genaue Regulation vieler dieser Modifikationen und ihre Rolle in zusätzlichen Ereignissen im Zellkern, wie z.B. der RNA-Prozessierung, weitgehend unbekannt. Eine wichtige Hilfsfunktion bei der Leitung der Positionierung der kovalenten Histon-Modifikation an spezifische Regionen des Genoms leistet die Transkriptions-Maschinerie selbst.

Dabei spielt der Phosphorylierungsstatus der CTD eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung Chromatin-modifizierender Enzyme. Sowohl Serin-5-Phosphorylierung (durch TFIIH/CDK7) als auch Serin-2-Phosphorylierung (P-TEFb/CDK9) beeinflussen die Bindung Chromatin-modifizierender Enzyme wie das Histon H3-Lysin-36 (H3K36) methylierende Enzym Set2 (Hefe) bzw. SETD2 in Säugetieren (Egloff und Murphy, 2008). Erst kürzlich wurde von der Arbeitsgruppe von Steven Johnsen in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Hemmung bzw. der siRNA vermittelte Knockdown von CDK9 zu einem nahezu vollständigen Verlust der Histon H2B-Monoubiquitinylierung (H2Bub1) führt. Es wurde gezeigt, dass die CDK9-abhängige Serin-2-Phosphorylierung der CTD, und weder Phosphoserin-5 und -7, noch die Transkription an sich für H2Bub1 benötigt wird (Pirngruber et al., 2009). Im Menschen hängt sowohl die H3K4- als auch die H3K79-Trimethylierung (H3K4me<sub>3</sub>; H3K79me<sub>3</sub>) von der H2Bub1 ab, die in menschlichen Zellen von der E3-Ubiquitin-Ligase RNF 20/40 ausgeführt wird (Kim et al, 2005; Zhu et al, 2005). Überraschenderweise benötigt nur ein Teil der Gene H2Bub1 für ihre Expression, obwohl diese Modifikation an fast allen aktiven Genen zu finden ist (Minsky et al, 2008; Shema et al, 2008).

Neben der H2Bub1 wird gleichzeitig die Bindung von einigen Chromatin-Modifikatoren durch die Phosphorylierung der Pol II-CTD beeinflusst. So binden die H3K4- und H3K36-Methyltransferasen Set1 und Set2, direkt an die Serin-5- und/oder Serin-2-phosphorylierte Pol II-CTD (Phatnani und Greenleaf, 2006; Yoh et al., 2008). Folglich beeinträchtigt auch der Knockdown von CDK9 die Level der H3K4me<sub>3</sub> und H3K36me<sub>3</sub> (Pirngruber et al., 2009). Dies wird durch eine frühere Studie bestätigt, bei der gezeigt wurde, dass die Hemmung der CDK9 durch Flavopiridol zu einer Abnahme der H3K4me<sub>3</sub> und der H3K36me<sub>3</sub> am HIV1-Gen führte (Zhou et al., 2004). Die Transkriptions-abhängige H3K36-Methylierung durch Set2 führt in der Hefe zu der Rekrutierung einer Histon-Deacetylase, die wiederum hilft kryptische Promotoren abzuschalten (Workman, 2006). Andere Chromatin-Modifikatoren können sich an dem RNA-Bestandteil des Transkriptions-Elongations-Komplex (TEK) festhalten. So wird z.B. in der Zuckmücke *Chiromonus tentans* eine Histon-Acetyltransferase zum aktiv transkribiertem Chromatin geleitet, indem ein Komplex aus dem RNA-Binde-Protein Hrp65 und Actin die naszierende RNA binden (Sjolinder et al., 2005). Da einige Modifikatoren dem Pol II-TEK während der Transkription folgen, besteht die primäre Funktion mancher Transkriptionseinheiten nicht darin, ein RNA-Transkript zu



produzieren, sondern eine Chromatindomäne festzulegen, die spezifische Histon-Markierungen trägt. Auf diese Weise kann ein durchlaufener Transkriptionszyklus tiefgreifenden Einfluss auf die zukünftige Expression dieser Sequenz ausüben. Erst kürzlich wurde in der Hefe eine *antisense*-RNA des Gal10-Gens identifiziert, die nur in knapp 5% der Zellen zu finden ist. Dennoch reicht die transiente Gegenwart des TEK an diesem Genlocus aus, um eine stabile H3K36-Trimethylierung und H3-Deacetylierung zu etablieren (Houseley et al., 2008).

Paradoxerweise spielt die Pol II-Transkription eine wesentliche Rolle bei der Etablierung von Transkriptions-inaktivem Heterochromatin. Dieses neue Modell beruht auf der Inaktivierung des Chromatins der Zentromere in *S. pombe* (Moazed, 2009). Diese Inaktivierung wird durch den RITS-Komplex (RNA-induzierte Initiation von transkriptionellem Gen-silencing) festgelegt, der die Methyltransferase CLRC rekrutiert. CLRC wiederum sorgt für das charakteristische Merkmal von Heterochromatin, methyliertem H3K9. Der RITS-Komplex wird durch die Bindung seiner Untereinheit AGO1 (*Argonaute* 1) an kurze RNA-Duplexe aus siRNA und naszierender Pol II-Transkripte an den TEK rekrutiert, wenn die Polymerase die Zentromere überschreibt. Die Transkription dieser zentromeren Wiederholungen findet in einem kleinen Zeitfenster während der S-Phase statt. Dieser Vorgang reicht aber aus um einen Heterochromatin-Status zu etablieren, der den ganzen Zellzyklus über Bestand hat. Dieses Modell wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Stilllegung der Zentromere in *S. pombe* durch Mutationen in den Untereinheiten Rpb2 und Rpb7 der RNA-Polymerase II gezielt gestört werden kann (Djupedal et al., 2005; Kato et al., 2005). Zudem helfen Spleiß-Faktoren, deren Interaktion mit Pol II schon in anderem Zusammenhang gezeigt wurde, die Stilllegung der Zentromere zu erhalten (Bayne et al., 2008). In Pflanzen bildet die nicht-essenzielle RNA-Polymerase Pol V ein Gerüst für die kotranskriptionelle Stilllegung von Genen. Pol V besitzt ebenfalls eine repetitive Domäne an ihrem C-Terminus, die zwar nicht mit der Pol II-CTD verwandt ist, deren WG/GW-reichen Wiederholungen aber, ähnlich der Pol II-CTD-Heptade, als eine Andockstelle für andere Proteine (z.B. AGO4) fungieren (El-Shami et al., 2007; Till und Ladurner, 2007). Befindet sich AGO4 an dieser Domäne, könnte es über die Bindung an RNA-Duplexe aus siRNA und den naszierenden Transkripten die Stilllegung der Gene einleiten (Wierzbicki et al., 2008). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RNA-Polymerasen, neben der kotranskriptionellen Prozessierung der Prä-mRNA, auch für die kotranskriptionelle

Stilllegung von bestimmten Genen verantwortlich sind.

Der Pol II-TEK rekrutiert nicht nur Histon-Modifikatoren, sondern platziert wahrscheinlich auch andere Chromatin-Proteine entlang der Chromosomen, einschließlich der Histone selbst. Die Ausführung der Transkription beeinflusst die Positionierung von Nukleosomen, indem ihre Entfernung direkt vor dem TEK und ihr Austausch, nachdem der TEK durchgelaufen ist, angeregt wird (Workman, 2006). Dieser Effekt wird zum Teil von Histon-Chaperonen und *Remodeler*-Proteinen vermittelt, die zusammen mit dem TEK wandern. In der Hefe begleiten der *Remodelling*-Komplex SWI/SNF und das Histon-H2A/H2B-Chaperon FACT die Pol II und ermöglichen die Transkriptions-gekoppelte Räumung und Neuordnung der Histone (Workman, 2006). Ob diese Faktoren, neben den mobilisierten Histonen, direkt an den TEK binden ist bisher nicht bekannt. Es wäre jedoch denkbar, dass ein unabhängiger Effekt in Folge der Torsionsspannung, die in der DNA aufgebaut wird, die Lokalisierung von Chromatin-assoziiierenden Proteinen beeinflusst. Wenn ein eingespanntes Templat transkribiert wird, bilden sich zwei extrem verdrillte Domänen: eine positive vor, und eine negative hinter der Polymerase. Die positive Verdrillung drängt die H2A/H2B-Dimere *in vitro* aus dem Nukleosom, was die Entfernung der Nukleosomen *in vivo* erklären könnte (Levchenko et al., 2005). Außerdem binden *in vitro* Histone, die durch die Transkription durch die T7 RNA-Polymerase vom Chromatin verdrängt wurden, stärker an das RNA-Transkript, als an die konkurrierende DNA (Peng und Jackson, 1997). Die Entfernung der Histone durch die passierende Polymerase könnte demnach zu einer Bindung an das naszierende Transkript führen, wenn es keinen Mechanismus gäbe, der diese Situation verhindert. Andererseits könnte eine vorübergehende Interaktion der Histone mit der naszierenden RNA dazu dienen, ein Reservoir an Histonen nahe der Transkriptionsstelle anzulegen, das schnell für den Wiederaufbau der Nukleosomen genutzt werden könnte. Da die CTD-Struktur der DNA ja soweit ähnelt, dass sie zumindest *in vitro* direkt mit dem Templat interagiert, wäre zudem denkbar, dass sie als eine Art vorübergehende Auffangstation für die Bausteine der entfernten Nukleosomen dient. So könnte die CTD die Histon-Proteine entweder direkt binden oder zusammen mit dem nicht-transkribierten DNA-Strang ein Gerüst bilden, an das die Histon-Proteine binden könnten. Dadurch könnten diese in der Nähe der Transkriptionsstelle gehalten werden und für einen Wiederaufbau der Nukleosomen zur Verfügung ständen.

## 4.8 Ausblick

Die Erweiterung des CTD-Kodes um vier zusätzliche Modifikationen (Tyr1-P, Thr4-P, Thr4-GlcNAc und Ser7-P) wirft zusätzliche Fragen auf, von denen nur einzelne im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden konnten. Welche Rolle spielen die Modifikationen während der Expression Pol II-transkribierter Gene? Haben außer Phosphoserin-7 auch andere Markierungen, einzeln oder in Kombination, eine genspezifische Wirkung? Welche Faktoren binden an welche Wiederholungseinheiten mit welchem Modifikationsmuster? Verhindern bestimmte Modifikationen wiederum diese Interaktionen? Welche Enzyme sind für diese Modifikationen zuständig und kann die gleiche Modifikation, wenn sie von unterschiedlichen Enzymen angebracht wird verschiedene Auswirkungen haben? Um den CTD-Kode vollständig verstehen zu können, ist es also nötig mehr Informationen über dessen Modifikationen in einzelnen Wiederholungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Transkriptionszyklus zu sammeln. Außerdem muss untersucht werden, wie diese Modifikationen die Bindung von anderen Proteinen an die CTD beeinträchtigen und ob bestimmte Modifikationsmuster bei der Expression bestimmter Gene vorherrschen. Die produzierten monoklonalen Antikörper gegen alle fünf Phosphorylierungsstelle können gerade bei letzterem Punkt unschätzbare Dienste leisten und zur Charakterisierung von Veränderungen des CTD-Phosphorylierungsmusters während der Transkription beitragen. Dennoch können sie keine genaue Information darüber liefern welche und wie viele Modifikationen auf individuellen Heptads oder Heptadpaaren gleichzeitig bestehen. Außerdem verhindern manche Modifikationskombinationen die Erkennung gänzlich. Eine Lösung für diese Probleme könnte die massenspektrometrische Analyse von aufgereinigten Pol II-Molekülen und ihrer CTD liefern. Bisher war es nur möglich den distalen Teil der CTD in der Massenspektrometrie zu untersuchen, da dieser Abschnitt der CTD viele Abweichungen von der Konsensus-Sequenz enthält, wodurch die Wiederholungseinheiten individuell zu identifizieren sind. Da der proximale CTD-Abschnitt hauptsächlich aus Konsensus-Wiederholungen zusammengesetzt ist, konnte bisher nicht zwischen den einzelnen CTD-Wiederholungen dieses Bereichs unterschieden werden. Ein Projekt unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Axel Imhof versucht

mithilfe von wenigen Insertionen zwischen mehrere funktionelle Einheiten nun rekombinante Polymerasen mit asymmetrischer CTD zu generieren. Sollten sich Zellen mit diesen rekombinanten Polymerasen als lebensfähig herausstellen, könnten neue Erkenntnisse über den Modifikationsstatus der CTD-Wiederholungen und Hinweise auf deren Funktion gewonnen werden. Die nächsten 20 Jahre der CTD-Forschung versprechen demnach genauso spannend zu werden wie die vergangenen 20 Jahre, und der CTD-Kode könnte sich als bei weitem komplizierter herausstellen, als er momentan erscheint.

## 5. Literaturverzeichnis

### A

Aberg, E., Torgersen, K. M., Johansen, B., Keyse, S. M., Perander, M., and Seternes, O. M. (2009). Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *J Biol Chem* 284, 19392-19401.

Ahn, S. H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* 13, 67-76.

Akhtar, M. S., Heidemann, M., Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Chapman, R. D., Eick, D., and Ansari, A. Z. (2009). TFIIF kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 34, 387-393.

Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIIF is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407, 102-106.

Akoulitchev, S., Makela, T. P., Weinberg, R. A., and Reinberg, D. (1995). Requirement for TFIIF kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 377, 557-560.

Allison, L. A., Wong, J. K., Fitzpatrick, V. D., Moyle, M., and Ingles, C. J. (1988). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol Cell Biol* 8, 321-329.

Amberg, D. C., Goldstein, A. L., and Cole, C. N. (1992). Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* 6, 1173-1189.

Ammosova, T., Berro, R., Jerebtsova, M., Jackson, A., Charles, S., Klase, Z., Southerland, W., Gordeuk, V. R., Kashanchi, F., and Nekhai, S. (2006). Phosphorylation of HIV-1 Tat by CDK2 in HIV-1 transcription. *Retrovirology* 3, 78.

### B

Barilla, D., Lee, B. A., and Proudfoot, N. J. (2001). Cleavage/polyadenylation factor IA associates with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 445-450.

Bartolomei, M. S., and Corden, J. L. (1995). Clustered alpha-amanitin resistance mutations in mouse. *Mol Gen Genet* 246, 778-782.

Baskaran, R., Chiang, G. G., Mysliwiec, T., Kruh, G. D., and Wang, J. Y. (1997). Tyrosine phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by the Abl-related gene product. *J Biol Chem* 272, 18905-18909.

Baskaran, R., Chiang, G. G., and Wang, J. Y. (1996). Identification of a binding site in c-Abl tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 16, 3361-3369.

Baskaran, R., Dahmus, M. E., and Wang, J. Y. (1993). Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11167-11171.

Baskaran, R., Escobar, S. R., and Wang, J. Y. (1999). Nuclear c-Abl is a COOH-terminal repeated domain (CTD)-tyrosine (CTD)-tyrosine kinase-specific for the mammalian RNA polymerase II: possible role in transcription elongation. *Cell Growth Differ* 10, 387-396.

Bayne, E. H., Portoso, M., Kagansky, A., Kos-Braun, I. C., Urano, T., Ekwall, K., Alves, F., Rappsilber, J., and Allshire, R. C. (2008). Splicing factors facilitate RNAi-directed silencing in fission yeast. *Science* 322, 602-606.

Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.

Blencowe, B. J. (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126, 37-47.

Boeing, S., Rigault, C., Heidemann, M., Eick, D., and Meisterernst, M. (2010) RNA polymerase II C-terminal heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is established in a mediator-dependent fashion. *J Biol Chem* 285, 188-196.

Bonnet, F., Vigneron, M., Bensaude, O., and Dubois, M. F. (1999). Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic Acids Res* 27, 4399-4404.

Bregman, D. B., Pestell, R. G., and Kidd, V. J. (2000). Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Front Biosci* 5, D244-257.

Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nat Struct Biol* 10, 679-680.

Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol* 17, 257-261.

Byers, S. A., Price, J. P., Cooper, J. J., Li, Q., and Price, D. H. (2005). HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *J Biol Chem* 280, 16360-16367.

**C**

Chapman, R. D., Conrad, M., and Eick, D. (2005). Role of the mammalian RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) nonconsensus repeats in CTD stability and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 25, 7665-7674.

Chapman, R. D., Heidemann, M., Albert, T. K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318, 1780-1782.

Chapman, R. D., Heidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* 24, 289-296.

Chapman, R. D., Palancade, B., Lang, A., Bensaude, O., and Eick, D. (2004). The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability. *Nucleic Acids Res* 32, 35-44.

Cho, E. J., Kobor, M. S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev* 15, 3319-3329.

Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X. J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* 18, 5355-5363.

Colot, H. V., Stutz, F., and Rosbash, M. (1996). The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20, the small subunit of the nuclear cap-binding complex. *Genes Dev* 10, 1699-1708.

Comer, F. I., and Hart, G. W. (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40, 7845-7852.

Coppola, J. A., Field, A. S., and Luse, D. S. (1983). Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1251-1255.

Corden, J. L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 15, 383-387.

Cramer, P. (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 12, 89-97.

Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., and Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640-649.

Cramer, P., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.

Custodio, N., Antoniou, M., and Carmo-Fonseca, M. (2006). Abundance of the largest subunit of RNA polymerase II in the nucleus is regulated by nucleo-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* 312, 2557-2567.

Custodio, N., Vivo, M., Antoniou, M., and Carmo-Fonseca, M. (2007). Splicing- and cleavage-independent requirement of RNA polymerase II CTD for mRNA release from the transcription site. *J Cell Biol* 179, 199-207.

## D

de la Mata, M., and Kornblihtt, A. R. (2006). RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat Struct Mol Biol* 13, 973-980.

Deng, L., Ammosova, T., Pumfery, A., Kashanchi, F., and Nekhai, S. (2002). HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) and a dynamic association with CDK2 induce CTD phosphorylation and transcription from HIV-1 promoter. *J Biol Chem* 277, 33922-33929.

Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., and Gygi, S. P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10762-10767.

Dichtl, B., Blank, D., Sadowski, M., Hubner, W., Weiser, S., and Keller, W. (2002). Yhh1p/Cft1p directly links poly(A) site recognition and RNA polymerase II transcription termination. *Embo J* 21, 4125-4135.

Djupedal, I., Portoso, M., Spahr, H., Bonilla, C., Gustafsson, C. M., Allshire, R. C., and Ekwall, K. (2005). RNA Pol II subunit Rpb7 promotes centromeric transcription and RNAi-directed chromatin silencing. *Genes Dev* 19, 2301-2306.

Donner, A. J., Szostek, S., Hoover, J. M., and Espinosa, J. M. (2007). CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Mol Cell* 27, 121-133.

Douziech, M., Forget, D., Greenblatt, J., and Coulombe, B. (1999). Topological localization of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in the initiation complex. *J Biol Chem* 274, 19868-19873.

Du, L., and Warren, S. L. (1997). A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 136, 5-18.

Dubois, M. F., Bellier, S., Seo, S. J., and Bensaude, O. (1994). Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during heat shock and inhibition of transcription in HeLa cells. *J Cell Physiol* 158, 417-426.

Dubois, M. F., Marshall, N. F., Nguyen, V. T., Dahmus, G. K., Bonnet, F., Dahmus, M. E., and Bensaude, O. (1999). Heat shock of HeLa cells inactivates a nuclear protein



phosphatase specific for dephosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* 27, 1338-1344.

Dvir, A., Garrett, K. P., Chalut, C., Egly, J. M., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1996). A role for ATP and TFIIF in activation of the RNA polymerase II preinitiation complex prior to transcription initiation. *J Biol Chem* 271, 7245-7248.

## E

Egloff, S., and Murphy, S. (2008a). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24, 280-288.

Egloff, S., and Murphy, S. (2008b). Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in expression of small nuclear RNA genes. *Biochem Soc Trans* 36, 537-539.

Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R. D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.

Egloff, S., O'Reilly, D., and Murphy, S. (2008). Expression of human snRNA genes from beginning to end. *Biochem Soc Trans* 36, 590-594.

El Hage, A., Koper, M., Kufel, J., and Tollervey, D. (2008). Efficient termination of transcription by RNA polymerase I requires the 5' exonuclease Rat1 in yeast. *Genes Dev* 22, 1069-1081.

El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M. A., Jacobsen, S. E., Cooke, R., and Lagrange, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21, 2539-2544.

## F

Fish, R. N., and Kane, C. M. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim Biophys Acta* 1577, 287-307.

Flaherty, S. M., Fortes, P., Izaurralde, E., Mattaj, I. W., and Gilmartin, G. M. (1997). Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11893-11898.

Furumoto, T., Tanaka, A., Ito, M., Malik, S., Hirose, Y., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. (2007). A kinase subunit of the human mediator complex, CDK8, positively regulates transcriptional activation. *Genes Cells* 12, 119-132.

## G

Gebara, M. M., Sayre, M. H., and Corden, J. L. (1997). Phosphorylation of the carboxy-terminal repeat domain in RNA polymerase II by cyclin-dependent kinases is sufficient to inhibit transcription. *J Cell Biochem* 64, 390-402.

Gerber, H. P., Hagmann, M., Seipel, K., Georgiev, O., West, M. A., Litingtung, Y., Schaffner, W., and Corden, J. L. (1995). RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* 374, 660-662.

Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.

Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J., and Bentley, D. L. (2008). RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nat Struct Mol Biol* 15, 71-78.

Glover-Cutter, K., Larochelle, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R. P., and Bentley, D. L. (2009). TFIIH-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 29, 5455-5464.

Gudipati, R. K., Villa, T., Boulay, J., and Libri, D. (2008). Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain dictates transcription termination choice. *Nat Struct Mol Biol* 15, 786-794.

Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.

## H

Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11, 394-403.

Hampsey, M., and Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113, 429-432.

Hausmann, S., and Shuman, S. (2002). Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. *J Biol Chem* 277, 21213-21220.

He, X., Khan, A. U., Cheng, H., Pappas, D. L., Jr., Hampsey, M., and Moore, C. L. (2003). Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes Dev* 17, 1030-1042.

Heidemann, M. (2009). Analysis of RNA Polymerase II Mutants using the xCelligence System. Roche Focus Application Note; Roche Diagnostics GmbH.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2, 43-53.

Hernandez, N. (2001). Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J Biol Chem* 276, 26733-26736.

Herr, A. J., Jensen, M. B., Dalmay, T., and Baulcombe, D. C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118-120.

Hirata, A., Klein, B. J., and Murakami, K. S. (2008). The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* 451, 851-854.

Hirose, Y., and Manley, J. L. (1998). RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395, 93-96.

Hirose, Y., Tacke, R., and Manley, J. L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 13, 1234-1239.

Hirst, M., Kobor, M. S., Kuriakose, N., Greenblatt, J., and Sadowski, I. (1999). GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclin-dependent protein kinase SRB10/CDK8. *Mol Cell* 3, 673-678.

Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.

Houseley, J., Rubbi, L., Grunstein, M., Tollervey, D., and Vogelauer, M. (2008). A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Mol Cell* 32, 685-695.

## J

Jiang, Y., Yan, M., and Gralla, J. D. (1996). A three-step pathway of transcription initiation leading to promoter clearance at an activation RNA polymerase II promoter. *Mol Cell Biol* 16, 1614-1621.

## K

Kanin, E. I., Kipp, R. T., Kung, C., Slattery, M., Viale, A., Hahn, S., Shokat, K. M., and Ansari, A. Z. (2007). Chemical inhibition of the TFIIH-associated kinase Cdk7/Kin28 does not impair global mRNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5812-5817.

Kanno, T., Huettel, B., Mette, M. F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D. P., Matzke, M., and Matzke, A. J. (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet* 37, 761-765.

Kato, H., Goto, D. B., Martienssen, R. A., Urano, T., Furukawa, K., and Murakami, Y. (2005). RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science* 309, 467-469.

Kelly, W. G., Dahmus, M. E., and Hart, G. W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268, 10416-10424.

Keogh, M. C., Podolny, V., and Buratowski, S. (2003). Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 23, 7005-7018.

Kettenberger, H., Armache, K. J., and Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114, 347-357.

Kim, E., Du, L., Bregman, D. B., and Warren, S. L. (1997). Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* 136, 19-28.

Kim, J., Hake, S. B., and Roeder, R. G. (2005). The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Mol Cell* 20, 759-770.

Kim, M., Krogan, N. J., Vasiljeva, L., Rando, O. J., Nedeja, E., Greenblatt, J. F., and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517-522.

Kim, M., Vasiljeva, L., Rando, O. J., Zhelkovsky, A., Moore, C., and Buratowski, S. (2006). Distinct pathways for snoRNA and mRNA termination. *Mol Cell* 24, 723-734.

Kimura, H., Tao, Y., Roeder, R. G., and Cook, P. R. (1999). Quantitation of RNA polymerase II and its transcription factors in an HeLa cell: little soluble holoenzyme but significant amounts of polymerases attached to the nuclear substructure. *Mol Cell Biol* 19, 5383-5392.

Kireeva, M. L., Komissarova, N., Waugh, D. S., and Kashlev, M. (2000). The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *J Biol Chem* 275, 6530-6536.

Kizer, K. O., Phatnani, H. P., Shibata, Y., Hall, H., Greenleaf, A. L., and Strahl, B. D. (2005). A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol* 25, 3305-3316.

Knight, Z. A., and Shokat, K. M. (2005). Features of selective kinase inhibitors. *Chem Biol* 12, 621-637.

Komarnitsky, P., Cho, E. J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14, 2452-2460.

Komarnitsky, P. B., Michel, B., and Buratowski, S. (1999). TFIID-specific yeast TAF40 is essential for the majority of RNA polymerase II-mediated transcription in vivo. *Genes Dev* 13, 2484-2489.

Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., and Hampsey, M. (2004). Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* 14, 387-394.

Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., et al. (2002). Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* 16, 707-719.

## L

Larochelle, S., Merrick, K. A., Terret, M. E., Wohlbold, L., Barboza, N. M., Zhang, C., Shokat, K. M., Jallepalli, P. V., and Fisher, R. P. (2007). Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol Cell* 25, 839-850.

Lee, T. I., and Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34, 77-137.

Legagneux, V., Morange, M., and Bensaude, O. (1990). Heat-shock and related stress enhance RNA polymerase II C-terminal-domain kinase activity in HeLa cell extracts. *Eur J Biochem* 193, 121-126.

Levchenko, V., Jackson, B., and Jackson, V. (2005). Histone release during transcription: displacement of the two H2A-H2B dimers in the nucleosome is dependent on different levels of transcription-induced positive stress. *Biochemistry* 44, 5357-5372.

Lewis, J. D., Izaurralde, E., Jarmolowski, A., McGuigan, C., and Mattaj, I. W. (1996). A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev* 10, 1683-1698.

Lin, P. S., Dubois, M. F., and Dahmus, M. E. (2002). TFIIF-associating carboxyl-terminal domain phosphatase dephosphorylates phosphoserines 2 and 5 of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 277, 45949-45956.

Lindsey-Boltz, L. A., and Sancar, A. (2007). RNA polymerase: the most specific damage recognition protein in cellular responses to DNA damage? *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13213-13214.

Litingtung, Y., Lawler, A. M., Sebald, S. M., Lee, E., Gearhart, J. D., Westphal, H., and Corden, J. L. (1999). Growth retardation and neonatal lethality in mice with a homozygous deletion in the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Gen Genet* 261, 100-105.

Liu, P., Greenleaf, A. L., and Stiller, J. W. (2008). The essential sequence elements required for RNAP II carboxyl-terminal domain function in yeast and their evolutionary conservation. *Mol Biol Evol* 25, 719-727.

Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, J. E., Jr., and Shenk, T. (1987). A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8306-8310.

Lolli, G. (2009). Binding to DNA of the RNA-polymerase II C-terminal domain allows discrimination between Cdk7 and Cdk9 phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 37, 1260-1268.

Long, J. J., Leresche, A., Kriwacki, R. W., and Gottesfeld, J. M. (1998). Repression of TFIIH transcriptional activity and TFIIH-associated cdk7 kinase activity at mitosis. *Mol Cell Biol* 18, 1467-1476.

Lux, C., Albiez, H., Chapman, R. D., Heidinger, M., Meininghaus, M., Brack-Werner, R., Lang, A., Ziegler, M., Cremer, T., and Eick, D. (2005). Transition from initiation to promoter proximal pausing requires the CTD of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* 33, 5139-5144.

Lykke-Andersen, S., and Jensen, T. H. (2007). Overlapping pathways dictate termination of RNA polymerase II transcription. *Biochimie* 89, 1177-1182.

## **M**

Makela, T. P., Parvin, J. D., Kim, J., Huber, L. J., Sharp, P. A., and Weinberg, R. A. (1995). A kinase-deficient transcription factor TFIIH is functional in basal and activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5174-5178.

Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D. H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* 271, 27176-27183.

Matsuda, S., Kawasaki, H., Moriguchi, T., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1995). Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J Biol Chem* 270, 12781-12786.

Max, T., Sogaard, M., and Svejstrup, J. Q. (2007). Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *J Biol Chem* 282, 14113-14120.

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

Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19, 1401-1415.

Meininghaus, M., Chapman, R. D., Horndasch, M., and Eick, D. (2000). Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription. *J Biol Chem* 275, 24375-24382.

Meuer, K., Suppanz, I. E., Lingor, P., Planchamp, V., Gorické, B., Fichtner, L., Braus, G. H., Dietz, G. P., Jakobs, S., Bahr, M., and Weishaupt, J. H. (2007). Cyclin-dependent kinase 5 is an upstream regulator of mitochondrial fission during neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 14, 651-661.

Minsky, N., Shema, E., Field, Y., Schuster, M., Segal, E., and Oren, M. (2008). Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat Cell Biol* 10, 483-488.

Moazed, D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457, 413-420.

Munoz, M. J., Perez Santangelo, M. S., Paronetto, M. P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J. J., et al. (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* 137, 708-720.

## **N**

Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C. G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302, 2137-2140.

## **O**

Oelgeschlager, T. (2002). Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol* 190, 160-169.

Onodera, Y., Haag, J. R., Ream, T., Nunes, P. C., Pontes, O., and Pikaard, C. S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120, 613-622.

Osheim, Y. N., Proudfoot, N. J., and Beyer, A. L. (1999). EM visualization of transcription by RNA polymerase II: downstream termination requires a poly(A) signal but not transcript cleavage. *Mol Cell* 3, 379-387.

Osheim, Y. N., Sikes, M. L., and Beyer, A. L. (2002). EM visualization of Pol II genes in *Drosophila*: most genes terminate without prior 3' end cleavage of nascent transcripts. *Chromosoma* 111, 1-12.

## **P**

Pal, M., and Luse, D. S. (2003). The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5700-5705.

Palancade, B., and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem* 270, 3859-3870.

Patturajan, M., Schulte, R. J., Sefton, B. M., Berezney, R., Vincent, M., Bensaude, O., Warren, S. L., and Corden, J. L. (1998). Growth-related changes in phosphorylation of yeast RNA polymerase II. *J Biol Chem* 273, 4689-4694.

Payne, J. M., and Dahmus, M. E. (1993). Partial purification and characterization of two distinct protein kinases that differentially phosphorylate the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase subunit IIa. *J Biol Chem* 268, 80-87.

Pei, Y., Hausmann, S., Ho, C. K., Schwer, B., and Shuman, S. (2001). The length, phosphorylation state, and primary structure of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain dictate interactions with mRNA capping enzymes. *J Biol Chem* 276, 28075-28082.

Pei, Y., Schwer, B., and Shuman, S. (2003). Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control. *J Biol Chem* 278, 7180-7188.

Pei, Y., and Shuman, S. (2002). Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *J Biol Chem* 277, 19639-19648.

Peng, H. F., and Jackson, V. (1997). Measurement of the frequency of histone displacement during the *in vitro* transcription of nucleosomes: RNA is a competitor for these histones. *Biochemistry* 36, 12371-12382.

Perales, R., and Bentley, D. (2009). "Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol Cell* 36, 178-191.

Peterlin, B. M., and Price, D. H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23, 297-305.



Peters, A. H., and Schubeler, D. (2005). Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr Opin Cell Biol* 17, 230-238.

Peterson, C. L., Kruger, W., and Herskowitz, I. (1991). A functional interaction between the C-terminal domain of RNA polymerase II and the negative regulator SIN1. *Cell* 64, 1135-1143.

Peterson, S. R., Jesch, S. A., Chamberlin, T. N., Dvir, A., Rabindran, S. K., Wu, C., and Dynan, W. S. (1995). Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by RNA polymerase II transcriptional activator proteins. *J Biol Chem* 270, 1449-1454.

Phatnani, H. P., and Greenleaf, A. L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.

Pinhero, R., Liaw, P., Bertens, K., and Yankulov, K. (2004). Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. *Eur J Biochem* 271, 1004-1014.

Pirngruber, J., Shchebet, A., Schreiber, L., Shema, E., Minsky, N., Chapman, R. D., Eick, D., Aylon, Y., Oren, M., and Johnsen, S. A. (2009). CDK9 directs H2B monoubiquitination and controls replication-dependent histone mRNA 3'-end processing. *EMBO Rep* 10, 894-900.

Poole, T. L., and Stevens, A. (1995). Comparison of features of the RNase activity of 5'-exonuclease-1 and 5'-exonuclease-2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Symp Ser*, 79-81.

Prelich, G. (2002). RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: emerging clues to their function. *Eukaryot Cell* 1, 153-162.

Price, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 20, 2629-2634.

Price, D. H. (2008). Poised polymerases: on your mark.get set.go! *Mol Cell* 30, 7-10.

Proudfoot, N. J. (1989). How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 14, 105-110.

## Q

Qiu, H., Hu, C., and Hinnebusch, A. G. (2009). Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters. *Mol Cell* 33, 752-762.

## R

Ramanathan, Y., Rajpara, S. M., Reza, S. M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M. B., and Pe'ery, T. (2001). Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J Biol Chem* 276, 10913-10920.

Reyes-Reyes, M., and Hampsey, M. (2007). Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation. *Mol Cell Biol* 27, 926-936.

Rosonina, E., and Blencowe, B. J. (2004). Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3'-end cleavage. *Rna* 10, 581-589.

Ryan, K., Murthy, K. G., Kaneko, S., and Manley, J. L. (2002). Requirements of the RNA polymerase II C-terminal domain for reconstituting pre-mRNA 3' cleavage. *Mol Cell Biol* 22, 1684-1692.

## S

Sadowski, M., Dichtl, B., Hubner, W., and Keller, W. (2003). Independent functions of yeast Pcf11p in pre-mRNA 3' end processing and in transcription termination. *Embo J* 22, 2167-2177.

Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-2440.

Seipel, K., Georgiev, O., and Schaffner, W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *Embo J* 11, 4961-4968.

Shema, E., Tirosh, I., Aylon, Y., Huang, J., Ye, C., Moskovits, N., Raver-Shapira, N., Minsky, N., Pirngruber, J., Tarcic, G., et al. (2008). The histone H2B-specific ubiquitin ligase RNF20/hBRE1 acts as a putative tumor suppressor through selective regulation of gene expression. *Genes Dev* 22, 2664-2676.

Sims, R. J., 3rd, Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004a). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* 18, 2437-2468.

Sims, R. J., 3rd, Mandal, S. S., and Reinberg, D. (2004b). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16, 263-271.

Sjolinder, M., Bjork, P., Soderberg, E., Sabri, N., Farrants, A. K., and Visa, N. (2005). The growing pre-mRNA recruits actin and chromatin-modifying factors to transcriptionally active genes. *Genes Dev* 19, 1871-1884.

Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J., et al. (1996). A structural basis for

substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* 16, 6486-6493.

Steinmetz, E. J., Warren, C. L., Kuehner, J. N., Panbehi, B., Ansari, A. Z., and Brow, D. A. (2006). Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Mol Cell* 24, 735-746.

Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.

Sterner, D. E., Lee, J. M., Hardin, S. E., and Greenleaf, A. L. (1995). The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol Cell Biol* 15, 5716-5724.

Stevens, A., and Poole, T. L. (1995). 5'-exonuclease-2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and features of ribonuclease activity with comparison to 5'-exonuclease-1. *J Biol Chem* 270, 16063-16069.

Stillier, J. W., and Cook, M. S. (2004). Functional unit of the RNA polymerase II C-terminal domain lies within heptapeptide pairs. *Eukaryot Cell* 3, 735-740.

Sudol, M., Sliwa, K., and Russo, T. (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett* 490, 190-195.

Suganuma, T., and Workman, J. L. (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* 135, 604-607.

Suzuki, M. (1990). The heptad repeat in the largest subunit of RNA polymerase II binds by intercalating into DNA. *Nature* 344, 562-565.

## T

Takagaki, Y., and Manley, J. L. (1998). Levels of polyadenylation factor CstF-64 control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B cell differentiation. *Mol Cell* 2, 761-771.

Takagaki, Y., Seipelt, R. L., Peterson, M. L., and Manley, J. L. (1996). The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation. *Cell* 87, 941-952.

Teixeira, A., Tahiri-Alaoui, A., West, S., Thomas, B., Ramadass, A., Martianov, I., Dye, M., James, W., Proudfoot, N. J., and Akoulitchev, A. (2004). Autocatalytic RNA cleavage in the human beta-globin pre-mRNA promotes transcription termination. *Nature* 432, 526-530.

Tetsu, O., and McCormick, F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* 3, 233-245.

Till, S., and Ladurner, A. G. (2007). RNA Pol IV plays catch with Argonaute 4. *Cell* 131, 643-645.

Trigon, S., Serizawa, H., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Jackson, S. P., and Morange, M. (1998). Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases. *J Biol Chem* 273, 6769-6775.

## V

Vasiljeva, L., Kim, M., Mutschler, H., Buratowski, S., and Meinhart, A. (2008a). The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 15, 795-804.

Vasiljeva, L., Kim, M., Terzi, N., Soares, L. M., and Buratowski, S. (2008b). Transcription termination and RNA degradation contribute to silencing of RNA polymerase II transcription within heterochromatin. *Mol Cell* 29, 313-323.

Vassilyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417, 712-719.

Venetianer, A., Dubois, M. F., Nguyen, V. T., Bellier, S., Seo, S. J., and Bensaude, O. (1995). Phosphorylation state of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) in heat-shocked cells. Possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein (MAP) kinases. *Eur J Biochem* 233, 83-92.

Viladevall, L., St Amour, C. V., Rosebrock, A., Schneider, S., Zhang, C., Allen, J. J., Shokat, K. M., Schwer, B., Leatherwood, J. K., and Fisher, R. P. (2009). TFIIH and P-TEFb coordinate transcription with capping enzyme recruitment at specific genes in fission yeast. *Mol Cell* 33, 738-751.

Villen, J., Beausoleil, S. A., Gerber, S. A., and Gygi, S. P. (2007). Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1488-1493.

Vincent, O., Kuchin, S., Hong, S. P., Townley, R., Vyas, V. K., and Carlson, M. (2001). Interaction of the Srb10 kinase with Sip4, a transcriptional activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 5790-5796.

Vojnic, E., Simon, B., Strahl, B. D., Sattler, M., and Cramer, P. (2006). Structure and carboxyl-terminal domain (CTD) binding of the Set2 SRI domain that couples histone H3 Lys36 methylation to transcription. *J Biol Chem* 281, 13-15.

## W

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., et al. (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12, 343-356.

Weake, V. M., and Workman, J. L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29, 653-663.

West, M. L., and Corden, J. L. (1995). Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics* 140, 1223-1233.

West, S., Gromak, N., and Proudfoot, N. J. (2004). Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* 432, 522-525.

Wierzbicki, A. T., Haag, J. R., and Pikaard, C. S. (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135, 635-648.

Wittenberg, C., and Reed, S. I. (2005). Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24, 2746-2755.

Wohlbold, L., Larochelle, S., Liao, J. C., Livshits, G., Singer, J., Shokat, K. M., and Fisher, R. P. (2006). The cyclin-dependent kinase (CDK) family member PNQALRE/CCRK supports cell proliferation but has no intrinsic CDK-activating kinase (CAK) activity. *Cell Cycle* 5, 546-554.

Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M., and Shilatifard, A. (2005). The Bur1/Bur2 complex is required for histone H2B monoubiquitination by Rad6/Bre1 and histone methylation by COMPASS. *Mol Cell* 20, 589-599.

Workman, J. L. (2006). Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev* 20, 2009-2017.

## X

Xu, Y. X., and Manley, J. L. (2004). Pinning down transcription: regulation of RNA polymerase II activity during the cell cycle. *Cell Cycle* 3, 432-435.

Xu, Y. X., and Manley, J. L. (2007). Pin1 modulates RNA polymerase II activity during the transcription cycle. *Genes Dev* 21, 2950-2962.

Xue, Y., Bai, X., Lee, I., Kallstrom, G., Ho, J., Brown, J., Stevens, A., and Johnson, A. W. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* RAI1 (YGL246c) is homologous to human DOM3Z and encodes a protein that binds the nuclear exoribonuclease Rat1p. *Mol Cell Biol* 20, 4006-4015.

## Y

Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* 21, 227-237.

Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41-51.

Yao, S., Neiman, A., and Prelich, G. (2000). BUR1 and BUR2 encode a divergent cyclin-dependent kinase-cyclin complex important for transcription in vivo. *Mol Cell Biol* 20, 7080-7087.

Yoh, S. M., Lucas, J. S., and Jones, K. A. (2008). The Iws1:Spt6:CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB/Setd2-mediated histone H3K36 methylation. *Genes Dev* 22, 3422-3434.

Yu, V. P., Baskerville, C., Grunenfelder, B., and Reed, S. I. (2005). A kinase-independent function of Cks1 and Cdk1 in regulation of transcription. *Mol Cell* 17, 145-151.

## Z

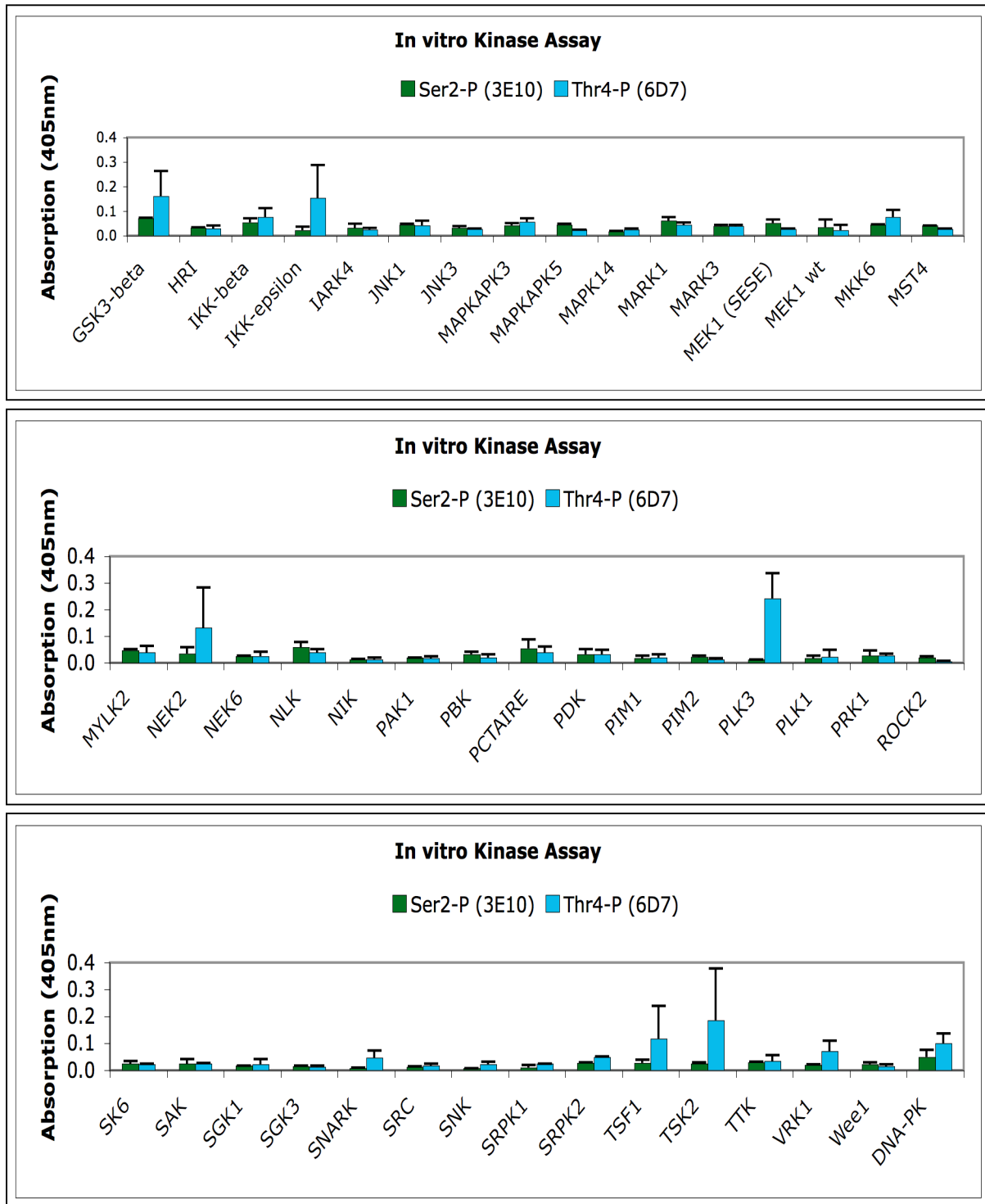
Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S. A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98, 811-824.

Zhang, J., and Corden, J. L. (1991). Identification of phosphorylation sites in the repetitive carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem* 266, 2290-2296.

Zhou, M., Deng, L., Lacoste, V., Park, H. U., Pumfery, A., Kashanchi, F., Brady, J. N., and Kumar, A. (2004). Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb kinase during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Virol* 78, 13522-13533.

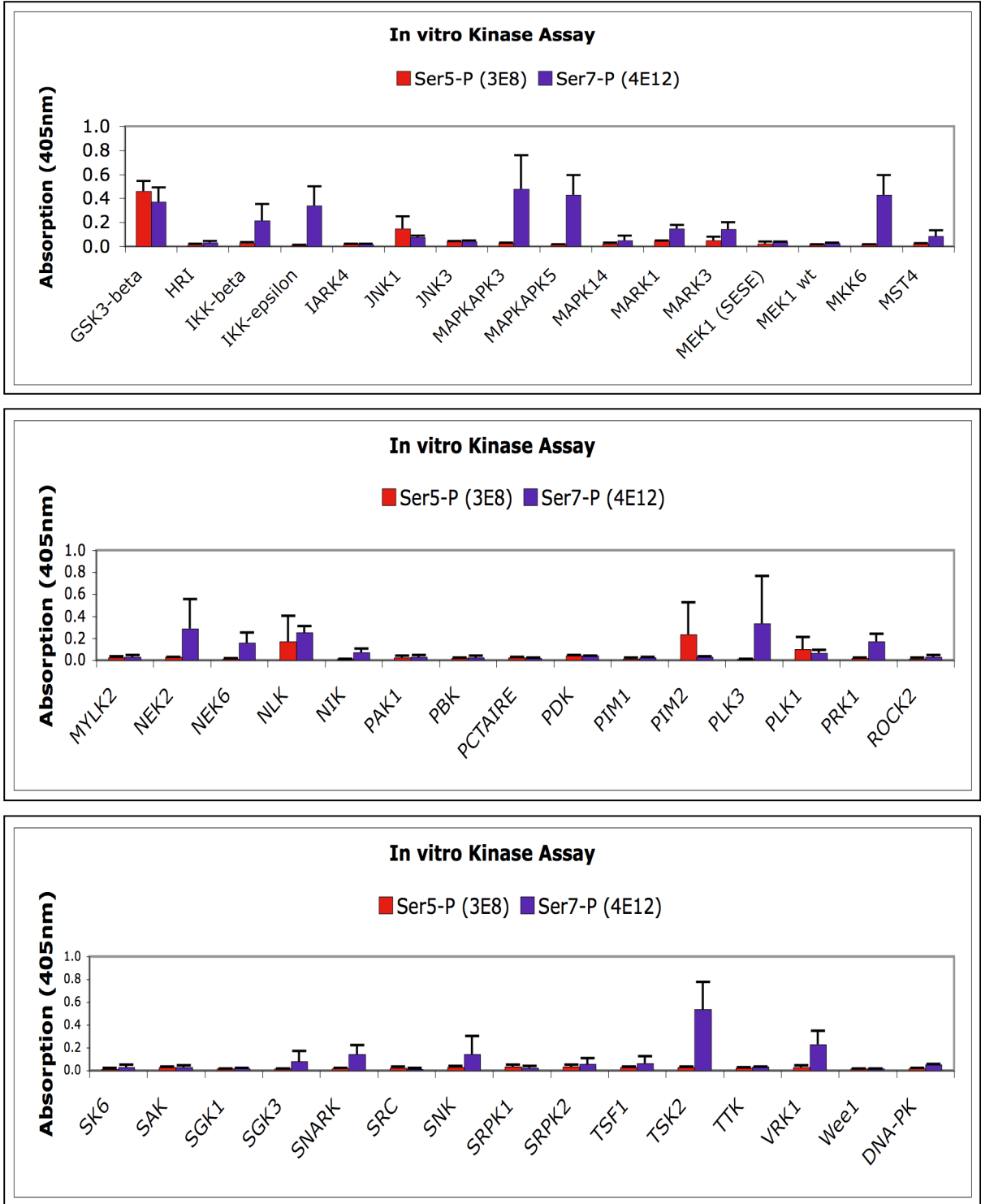
Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A. D., Mandal, S. S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* 20, 601-611.

## 6. Appendix



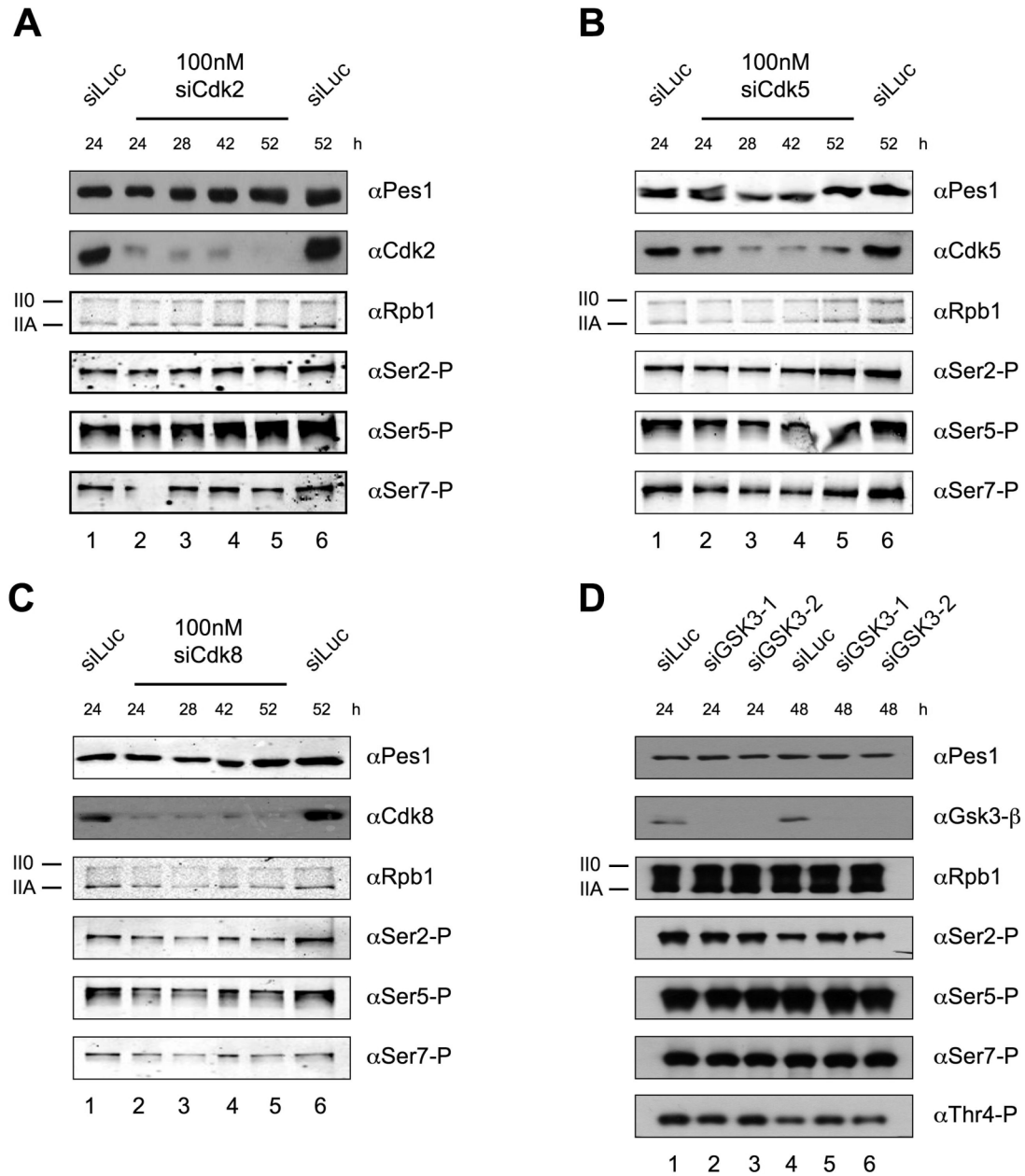
**Abb. A1. *In vitro*-Analyse potenzieller CTD-Kinasen.** (A) Quantifizierung der Kinase-Aktivität mittels ELISA bezüglich Serin-2- (grün) und Threonin-4-Phosphorylierung (türkis).

## Appendix

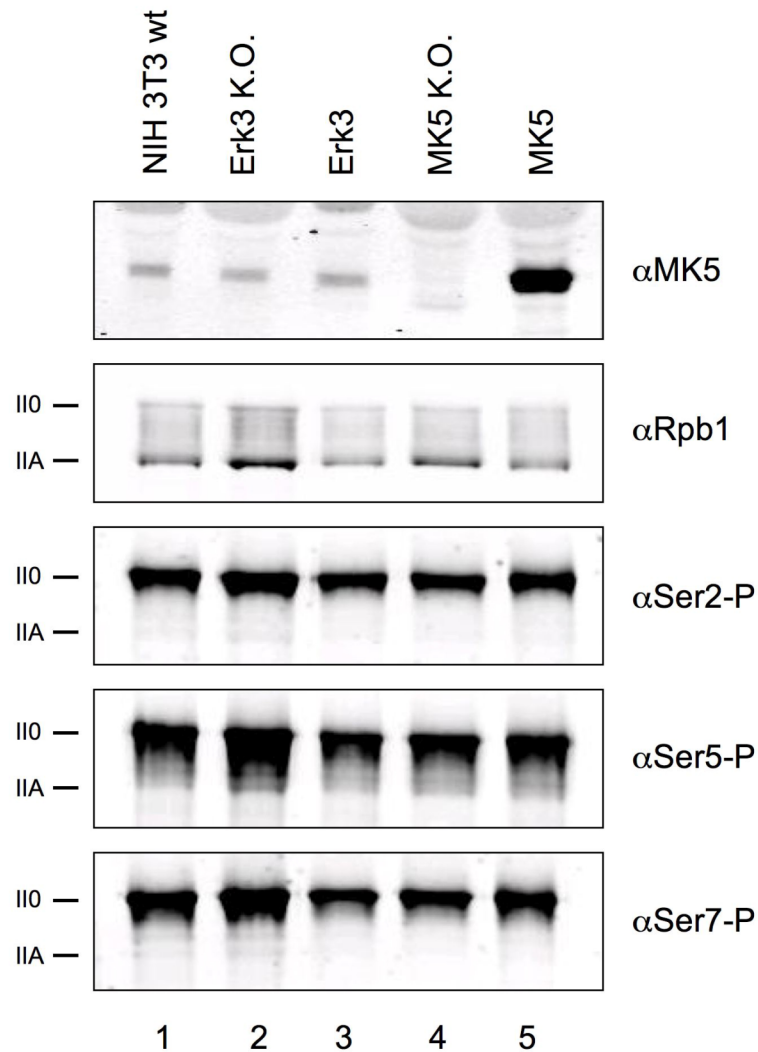


**Abb. A1. *In vitro*-Analyse potenzieller CTD-Kinasen.** (B) Quantifizierung der Kinase-Aktivität mittels ELISA bezüglich Serin-5- (rot) und Serin-7-Phosphorylierung (aubergine).

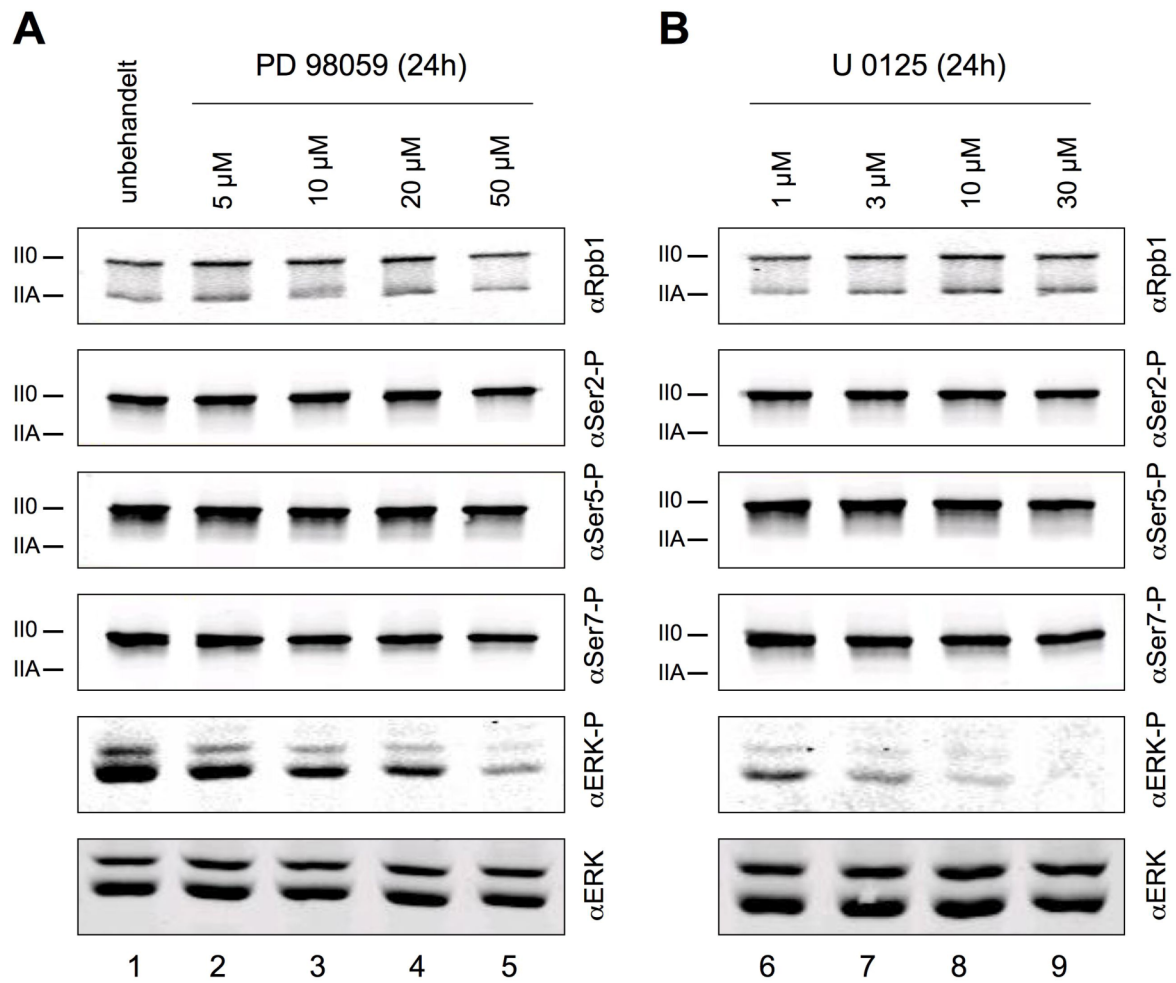




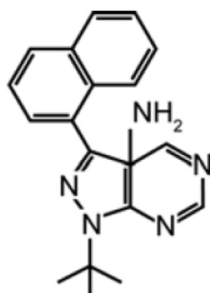
**Abb. A2. SiRNA vermittelter Knockdown potenzieller CTD-Kinasen.** (A-D) Western-Analyse nach dem Knockdown in U2OS-Zellen. Obwohl jeweils ein Großteil des Proteins verschwunden ist, bleiben die CTD-Phosphorylierungen von der Herabregulierung unbeeinträchtigt.



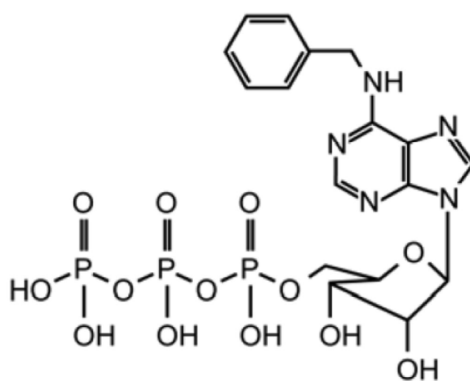
**Abb. A3. Überexpression und Knock-Out der MAPKAPK5.** Obwohl die Kinase MK5 in den *in vitro*-Kinase-Analysen die stärkste Aktivität bezüglich CTD-Serin-7-Phosphorylierung hatte, bleibt der Phosphorylierungsstatus der CTD trotz veränderter MK5-Level unbeeinträchtigt



**Abb. A4. Inhibition der MAP-Kinasen ERK1/2.** Obwohl der Anteil an aktiver ERK-Kinase (ERK-P) durch Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren stark abnimmt (A und B) bleiben die CTD-Phosphorylierungen unbeeinträchtigt.

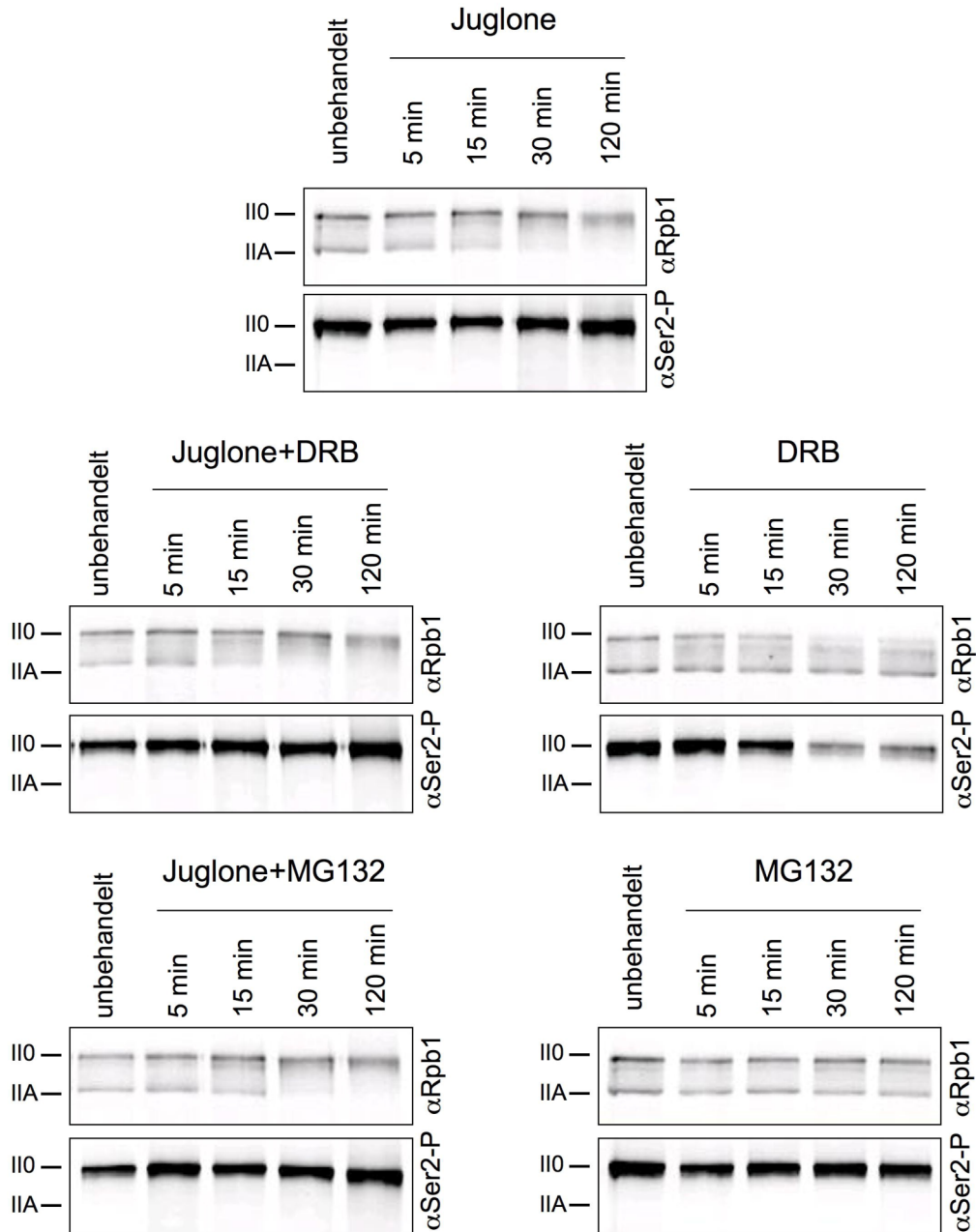


**1-NA-PP1**



**N<sup>6</sup>-Benzyl-ATP**

**Abb. A5. Chemische Struktur von 1-NA-PP1 und N<sup>6</sup>-Benzyl ATP**



**Abb. A6. Hemmung der PIN1-Aktivität durch Juglone.** U2OS-Zellen wurden für verschiedene Zeitpunkte mit dem Pin1-Inhibitor Juglone (150 $\mu$ M) allein und in Kombination mit dem CDK9-Inhibitor DRB (50 $\mu$ M) bzw. dem Proteasom-Inhibitor MG 132 (10 $\mu$ M) inkubiert. Die Hemmung von Pin1 führt zu einem vollständigen Shift der RNAP II in die Pol II0-Form, unabhängig ob gleichzeitig CDK9 oder das Proteasom inhibiert wird.

## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dirk Eick bedanken. Nicht nur für die vielen Ratschläge, Denkanstöße und fruchtbaren Diskussionen, sondern vor allem für die Zeit und Geduld, die er mir in manch schwierigen Phase entgegenbrachte.

Besonderer Dank gilt natürlich auch Dr. Rob Chapman, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und zusammen mit Dr. Marcus Conrad immer für eine lockere und heitere Stimmung sorgte, ohne dass die Wissenschaft dabei zu kurz kam. Ein herzliches Dankeschön auch für die Bereitstellung der CTD-Mutanten und sämtliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen Mitgliedern im „Pol-Team“, Corinna Hintermair und Roland Schüller danke ich für die schöne Zeit, sowie für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung, bei der sich immer einer auf den anderen verlassen konnte.

Bei Dr. Aseem Ansari und seiner Arbeitsgruppe, v.a. bei Dr. Sohail Akhtar möchte ich mich für die tolle Gelegenheit bedanken, ihr Labor und damit neue Menschen, aber auch neue Methoden kennenzulernen. Ich hoffe, dass diese enge und erfolgreiche Kooperation auch weiterhin bestehen bleibt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Elisabeth Kremmer und Andrew Flatley bedanken, ohne deren Mühen bei der Herstellung der Antikörper dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Ein herzliches Dankeschön auch für die Durchführung der vielen ELISA-Tests und die Hilfe bei den Kinase-Experimenten.

Außerdem möchte ich mich beim gesamten „Myc-Team“ bedanken, bei Dr. Anastassia Malamoussi, Dr. Michaela Rohmoser, Anita Gruber-Eber, Dr. Thomas Grimm, Bastian Mühl, Kaspar Burger und Dr. Thomas Harasim. Dankeschön sowohl für die Unterstützung in wissenschaftlichen Belangen, als auch für die entspannte und gute Atmosphäre, die in der Arbeitsgruppe geherrscht hat.

## Lebenslauf

Martin Heidemann

Geboren am 20.02.1981 in Heidenheim  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Berufserfahrung

05/2006 - heute

Helmholtzzentrum München, Deutsches  
Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Dissertation: "Untersuchung des Modifikationsmusters  
der Carboxy-terminalen Domäne der DNA-abhängigen  
RNA-Polymerase II und die Identifikation der Serin-7-  
Kinase"

### Studium

10/2000 – 04/2006

Ludwig-Maximilians-Universität München: Biologie  
(Genetik, Zellbiologie, Physiologie der Pflanzen,  
Biochemie)  
Diplom, Note: sehr gut (1,1)  
Diplomarbeit: "Herstellung und Charakterisierung  
monoklonaler Antikörper gegen die  
Phosphorylierungsstellen der Carboxy-  
terminalen Domäne der großen Untereinheit der  
RNA-Polymerase II" – Note: sehr gut (1,0)

### Hochschulreife

06/2000

Hochschulreife, gut (2,1);  
Karlsgymnasium Pasing München

### Veröffentlichungen

Boeing, S., Rigault, C., **Heidemann, M.**, Eick, D., and  
Meisterernst, M. (2010) RNA polymerase II C-terminal  
heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is  
established in a mediator-dependent fashion.  
J Biol Chem 285, 188-196.

Akhtar, M. S.\*, **Heidemann, M.\***, Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Chapman, R. D., Eick, D., and Ansari, A. Z. (2009). TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 34, 387-393.

(\* = geteilte Erstautorenschaft)

**Heidemann, M.** (2009). Analysis of RNA Polymerase II Mutants using the xCelligence System. Roche Focus Application Note; Roche Diagnostics GmbH.

Chapman, R. D., **Heidemann, M.**, Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* 24, 289-296.

Chapman, R. D., **Heidemann, M.**, Albert, T. K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318, 1780-1782.

### Präsentationen/Vorträge

- |           |   |
|-----------|---|
| 2006-2009 | Institutsinterne Vorträge zum Thema der Dissertation<br>Helmholtzzentrum, München   |
| 2009      | <u>Poster</u> : EMBO Workshop,<br>Messenger RNA 3' ends & gene expression<br>Oxford, UK<br><u>Poster</u> : 4 <sup>th</sup> HBGS Student Council Symposium,<br>Epigenetic Mechanisms in Disease and Development<br>Helsinki, Finnland<br><u>Short talk</u> : Genzentrum Seminarserie Systembiologie<br>"The TFIIH Kinase Kin28/Cdk7 phosphorylates CTD<br>residue serine-7 <i>in vivo</i> ", München |



## Curriculum vitae

---

- 2008 Poster: 8<sup>th</sup> EMBL Transcription meeting, Heidelberg
- Short talk: Seminarserie University of Wisconsin  
“Changing Modifications of RNA Polymerase II  
carboxy-terminal Domain”  
Madison, Wisconsin
- 2007 Poster: SFB Transregio 5 Symposium,  
Chromatin, Assembly and Inheritance of Functional  
States, München
- Poster: Spetses International Summer School,  
Molecular Mechanisms of Regeneration  
Spetses, Griechenland
- Short talk: Harvard-Munich-Meeting  
„RNA polymerase II CTD is phosphorylated at serine-7  
during transcription“, Eibsee
- 2006 Poster: TR5 1<sup>st</sup> Chromatin Summer School,  
Reimlingen