

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

**Charakterisierung der Threonin-4-Phosphorylierung der
carboxyterminalen Domäne (CTD) der großen Untereinheit
der RNA-Polymerase II**

Corinna Hintermair
München, Dezember 2011

Angefertigt am Helmholtz Zentrum München,
Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik,
Abteilung für Molekulare Epigenetik

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

Ich erkläre weiterhin, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

München, Dezember 2011

Corinna Hintermair

Dissertation eingereicht am 12.12.2011

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

Mündliche Prüfung am 24.05.2012

Zusammenfassung

In höheren Eukaryoten erfolgt die Transkription der Gene durch drei DNA-abhängige-RNA-Polymerasen (Pol-I, -II, -III) mit distinkter Funktion. Die RNA-Polymerase II (Pol-II) ist für die Transkription von mRNAs und kleinen RNAs, wie snRNAs, snoRNAs und miRNAs verantwortlich. Obwohl der Aufbau der eukaryotischen RNA-Polymerasen im enzymatischen Kern stark konserviert ist, besitzt allein die Pol-II eine zusätzliche carboxyterminale Domäne (CTD) an ihrer größten Untereinheit Rpb1. Die CTD der humanen Pol-II besteht aus 52 Heptapeptid-Wiederholungen mit der Konsensussequenz $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$. Diese Heptapeptid-Sequenz enthält fünf potenzielle Phosphorylierungsstellen. Die CTD dient als Bindungs-Plattform für Proteine, die an der Transkription, der mRNA-Prozessierung und der Histon-Modifikation beteiligt sind. Während der Transkription ist das Phosphorylierungsmuster der CTD dynamisch und ermöglicht so die Rekrutierung von Faktoren für die unterschiedlichen Phasen des Transkriptionszyklus. Spezifische monoklonale Antikörper ermöglichen den Nachweis von CTD-Modifikationen *in vivo*. Während die Serin-2-, Serin-5- und Serin-7-Phosphorylierung der CTD in Bezug auf den Zeitpunkt des Auftretens und der Funktion bereits gut charakterisiert wurde, ist über die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin-4 bis jetzt nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels monoklonaler Antikörper die Phosphorylierung von Threonin-4 als weitere Modifikationsmöglichkeit der CTD erstmals näher beschrieben.

Die Threonin-4-Phosphorylierung der CTD ist an die Transkription von Genen gekoppelt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Andrau konnte anhand von ChIP-Seq-Analysen gezeigt werden, dass die Threonin-4-Phosphorylierung erst sehr spät im Transkriptionszyklus im 3'-Bereich von Genen auftritt. ChIP-Seq-Analysen von Raji-Zellen mit konditional exprimierten Polymerase-Mutanten zeigten, dass Threonin-4 bereits während der Elongation der Transkription eine wichtige Rolle spielt. Polymerasen mit Austausch von Threonin-4 zu Alanin konnten die Transkription von Genen zwar normal initiieren, waren in der Elongation jedoch blockiert. Weiterhin konnte ich Plk3 (*Polo-like kinase3*) als CTD-Threonin-4-Kinase identifizieren. Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren, zeigten eine Zunahme der Threonin-4-Phosphorylierung einhergehend mit einer Erhöhung der Plk3-Proteinmenge. Plk3 scheint Threonin-4 stressabhängig zu phosphorylieren.

Zusammenfassung

Des Weiteren wurde die zelluläre Lokalisation von Pol-II, abhängig vom CTD-Phosphorylierungsmuster, charakterisiert. Ein besonderer Fokus lag hierbei auch auf der phosphorylierten Aminosäure Threonin-4. Die zelluläre Lokalisation der Threonin-4-phosphorylierten Pol-II ergab erstmals eine spezifische Assoziation von Pol-II mit den Centrosomen in der Mitose. Diese Assoziation wurde durch die Pol-II-spezifischen Antikörper Pol3.3. und 8WG16 bestätigt. Plk1 konnte als *in vitro* CTD-Threonin-4-Kinase identifiziert werden. Nach Synchronisation durch Nocodazol konnte eine Anreicherung eines Komplexes, bestehend aus Plk1 und Threonin-4-phosphorylierter Pol-II nachgewiesen werden. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine bestimmte Modifikationsform der Pol-II Zellzyklus-abhängig mit den Centrosomen assoziiert ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Threonin-4-Phosphorylierung der Pol-II eine wichtige Rolle während des Transkriptionszyklus und auch während des Zellzyklus spielt. Durch die Threonin-4-Phosphorylierung werden die Variabilität des CTD-Phosphorylierungsmusters und die Präzision verschiedenster Prozesse weiter gesteigert.

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht.

Mayer, A., Heidemann, M., Lidschreiber, M., Schrieck, A., Sun, M., **Hintermair, C.**, Kremer, E., Eick, D. and Cramer, P. (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to transcribing RNA polymerase II. *Science* (in Druck).

Hintermair, C., Heidemann, M., Koch, F., Fenouil, R., Descostes, N., Gut, M., Gut, I., Ferrier, P., Flatley, A., Kremmer, E., Chapman, R. D., Andrau, J. C. and Eick, D. (2012). Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase-3 and required for transcriptional elongation. *EMBO J.* 31, 000-000.

Koch, F., Fenouil, R., Gut, M., Cauchy, P., Albert, T. K., Zacarias-Cabeza, J., Spicuglia, S., de la Chapelle, A. L., Heidemann, M., **Hintermair, C.**, Eick, D., Gut, I., Ferrier, P. and Andrau, J. C. (2011). Transcription initiation platforms and GTF recruitment at tissue-specific enhancers and promoters. *Nat Struct Mol Biol* 18, 956-63.

Prenzel, T., Begus-Nahrman, Y., Kramer, F., Hennion, M., Hsu, C., Gorsler, T., **Hintermair, C.**, Eick, D., Kremmer, E., Simons, M., Beissbarth, T. and Johnsen, S. A. (2011). Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res* 71, 5739-53.

Heidemann, M., **Hintermair, C.**, Schueller, R., Voss, K. und Eick, D. (2011). Die CTD der RNA-Polymerase II - eine neue Ebene der Genregulation. *BIOspektrum* 03.11, 270-273.

Chapman, R. D., Heidemann, M., **Hintermair, C.** and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* 24, 289-96.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Zusammenfassung

Publikationen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 DNA-abhängige RNA-Polymerasen.....	1
1.2 CTD der RNA-Polymerase II.....	2
1.3 Der Transkriptionszyklus.....	5
1.3.1. Initiation der Transkription	5
1.3.2. Elongation der Transkription.....	8
1.3.3. Termination der Transkription.....	10
1.4 mRNA-Prozessierung	11
1.5 Chromatin ist eine natürliche Barriere für Transkription.....	12
1.6 Aufgabenstellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1. Chemikalien	16
2.1.2. Antikörper.....	17
2.1.3. Peptide	19
2.1.4. Plasmide.....	19

Inhaltsverzeichnis

2.1.5. SiRNA-Sequenzen	20
2.1.6. Puffer und Lösungen	20
2.1.7. Zelllinien	25
2.1.8. Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.9. Geräte.....	26
2.1.10. Software.....	27
2.2 Methoden	28
2.2.1. Zellkultur	28
2.2.1.1. Kultivierung der Zellen	28
2.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl	28
2.2.1.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	29
2.2.2. Western-Analyse	29
2.2.2.1. Lyse der Zellen.....	29
2.2.2.2. SDS-PAGE und Transfer	29
2.2.3. Zellproliferations-Assay	30
2.2.4. Immunfluoreszenzmikroskopie	31
2.2.5. Konfokal-Mikroskopie	32
2.2.6. Immunpräzipitationen	32
2.2.7. <i>In vitro</i> Analyse der rekombinanten Kinasen	33
2.2.8. SiRNA-Transfektion.....	34
2.2.9. Oxidativer Stress	34
2.2.10. Chromatin-Immunpräzipitation mit genomweiter Sequenzierung (ChIP-Seq-Analyse).....	35
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Einfluss bestimmter CTD-Aminosäurereste auf die Zellviabilität	37
3.2 Charakterisierung der CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper	40

Inhaltsverzeichnis

3.2.1. CTD-Threonin-4-Phosphorylierung in Gesamtzell-Extrakten	42
3.2.2. CTD-Phosphorylierungen in der Immunfluoreszenz.....	43
3.2.3. Ko-Immünpräzipitationen der CTD-Phosphorylierungen.....	45
3.3 Identifizierung der Threonin-4-Kinase in Säugetierzellen	46
3.3.1. Charakterisierung potenzieller CTD-Threonin-4-Kinasen <i>in vitro</i>	47
3.3.2. Plk3 phosphoryliert Threonin-4 <i>in vivo</i>	49
3.3.3. Auswirkung von oxidativem Stress auf die Kinase Plk3.....	50
3.4 Genomweite Profile der CTD-Phosphorylierungen in Säugetieren.....	51
3.5 Auswirkung der Thr4/Ala-Mutante auf die genomweite Verteilung der Pol-II	54
3.6 Charakterisierung einer mitosespezifischen Pol-II-Population.....	58
3.6.1. Lokalisation der Plk1-Kinase während des Zellzyklus.....	58
3.6.2. CTD-Phosphorylierungen während der Mitose	60
3.6.3. Charakterisierung der Threonin-4-Phosphorylierung während der Mitose.....	61
3.6.4. Lokalisation von Plk1 und Threonin-4-phosphorylierter Pol-II im Zellzyklus.....	63
3.6.5. Auswirkung der Plk1-Hemmung auf die CTD-Phosphorylierungen.....	65
3.6.6. Plk1 ist in einem Komplex mit Threonin-4-phosphorylierter Pol-II.....	69
4. Diskussion	72
4.1 Bedeutung einzelner Aminosäuren der CTD-Konsensussequenz.....	73
4.2 Threonin-4-Phosphorylierung ist eine neue CTD-Modifikation	74
4.3 Plk3 ist eine CTD-Threonin-4-Kinase	75
4.4 Auswirkungen von oxidativem Stress	78
4.5 Rolle der CTD-Threonin-4-Phosphorylierung im Transkriptionszyklus.....	80
4.5.1. mRNA 3'-Prozessierung.....	80
4.5.2. Elongation der Transkription.....	82

Inhaltsverzeichnis

4.6	Lokalisation der RNA-Polymerase II in der Zelle	85
4.7	Threonin-4-Phosphorylierung der CTD während der Mitose	86
4.7.1.	Plk1 eine weitere potenzielle CTD-Threonin-4-Kinase	88
4.7.2.	Die Rolle der mitosespezifischen Pol-II-Subpopulation	90
4.8	Ausblick.....	92
5.	Literaturverzeichnis	94
6.	Anhang	109
7.	Danksagung.....	112

1. Einleitung

Alle Organismen haben eine genau regulierte Genexpression, um Wachstum und Entwicklung zu kontrollieren und sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Die Expression der genetischen Information erfordert die Transkription des universellen Codes der Desoxyribonukleinsäuresequenz (DNA) in die Ribonukleinsäuresequenz (RNA). Diesem Prozess folgt die Translation, die mRNA als Matrize für die Proteinsynthese verwendet.

1.1 DNA-abhängige RNA-Polymerasen

Die Transkription ist der erste Schritt der Genexpression in den Zellen und erfolgt durch Proteinkomplexe, den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen. In Prokaryoten werden alle Gene von einer einzigen RNA-Polymerase in RNA-Moleküle überschrieben. In höheren Eukaryoten ist die Transkription der Gene dagegen auf drei verwandte RNA-Polymerasen mit distinkter Funktion aufgeteilt. Die RNA-Polymerase I (Pol-I) ist in den Nukleoli lokalisiert und transkribiert ribosomale Gene. Das primäre 45S rRNA-Transkript wird anschließend in die reife 5,8S-, 18S- und 28S-ribosomale RNA prozessiert. Die RNA-Polymerase II (Pol-II) ist im Nukleoplasma der Zelle lokalisiert und verantwortlich für die Transkription der proteinkodierenden Gene in mRNA. Des Weiteren transkribiert die Pol-II auch Gene für kleine nichtkodierende RNAs wie snRNAs, snoRNAs und miRNAs (Egloff und Murphy, 2008; Lee et al., 2004). Die nukleoplasmatisch lokalisierte RNA-Polymerase III (Pol-III) synthetisiert tRNAs, 5S rRNA, U6 snRNA und andere kleine RNAs mit teilweise noch unbekannter Funktion. Zudem wurden mit Pol-IV und Pol-V zwei weitere pflanzenspezifische RNA-Polymerasen beschrieben (Herr et al., 2005; Ream et al., 2009). Letztere transkribieren siRNAs, die genomweit die Methylierung von Cytosin in der DNA regulieren und darüber die Aktivität und Struktur von Chromatin (Matzke et al., 2009).

Die Struktur der RNA-Polymerasen wurde durch kristallographische Untersuchungen aufgeklärt. In Prokaryoten wurden fünf Untereinheiten identifiziert, die als Kernenzym bezeichnet werden: die Beta, Beta', zwei Alpha-Untereinheiten und die Omega-Untereinheit (Ebright, 2000). Die effiziente und korrekte Initiation bakterieller Gene benötigt eine weitere Untereinheit, Sigma, die die Bindung der Polymerase an die Promotor-DNA ermöglicht.

Eukaryotische RNA-Polymerasen sind komplexer aufgebaut und verfügen über 14 (Pol-I), 12 (Pol-II) bzw. 17 (Pol-III) Untereinheiten. Dabei bilden zehn Untereinheiten einen strukturell-konservierten Kern, während die zusätzlichen Untereinheiten in der Peripherie lokalisiert sind. Die 12 Untereinheiten von Pol-II formen einen Komplex von 514kDa, in dessen aktivem Zentrum ein Magnesiumion sitzt (Cramer et al., 2001). Die katalytische Domäne wird von den beiden größten Untereinheiten, Rpb1 und Rpb2, gebildet und ist an der mRNA-Synthese beteiligt. Rpb1 und Rpb2 befinden sich im Zentrum des Enzyms getrennt durch eine Cleft-Domäne und sind von den kleineren Untereinheiten umgeben (Cramer et al., 2008). Die zwei größten Untereinheiten weisen große funktionelle sowie strukturelle Homologien zu den katalytischen Beta- und Beta'-Untereinheiten der prokaryotischen RNA-Polymerase auf (Cramer et al., 2000). Auch innerhalb der eukaryotischen RNA-Polymerasen ist eine Konservierung vorhanden, denn fünf der kleineren Untereinheiten sind identisch (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 und Rpb12) (Cramer et al., 2008).

Obwohl der Aufbau der eukaryotischen RNA-Polymerasen im enzymatischen Kern stark konserviert ist, gibt es große Unterschiede in deren Peripherie. Die Pol-II besitzt als einzige der Säugetier-Polymerasen an der großen Untereinheit Rpb1 eine carboxyterminale Domäne (CTD), die 378 Aminosäuren umfasst.

1.2 CTD der RNA-Polymerase II

Die große Untereinheit Rpb1 der Pol-II besitzt am carboxyterminalen Ende eine einzigartige Struktur, die aus repetitiven Wiederholungen eines Konsensus-Heptapeptids mit der Sequenz Tyrosin-Serin-Prolin-Threonin-Serin-Prolin-Serin ($Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$) besteht und als CTD bezeichnet wird (Corden et al., 1985). Diese Struktur ist nicht in Pol-I und Pol-III vorhanden. Die Pol-II aller Vielzeller besitzt eine CTD, wobei die Anzahl der Heptapeptide mit der Komplexität des Organismus zu korrelieren scheint. So besitzt die CTD der Pol-II in *Plasmodium yoelii* nur 5 Wiederholungen, in *S. cerevisiae* 26, in *Drosophila melanogaster* 45 und in Maus und Mensch 52 Heptapeptid-Wiederholungen (Chapman et al., 2008; Abb. 1A). Die CTD ist lebensnotwendig, da Deletionen von mehr als der Hälfte der Wiederholungen in Hefe und Maus zu einer verminderten Zellviabilität führen (Meininghaus et al., 2000).

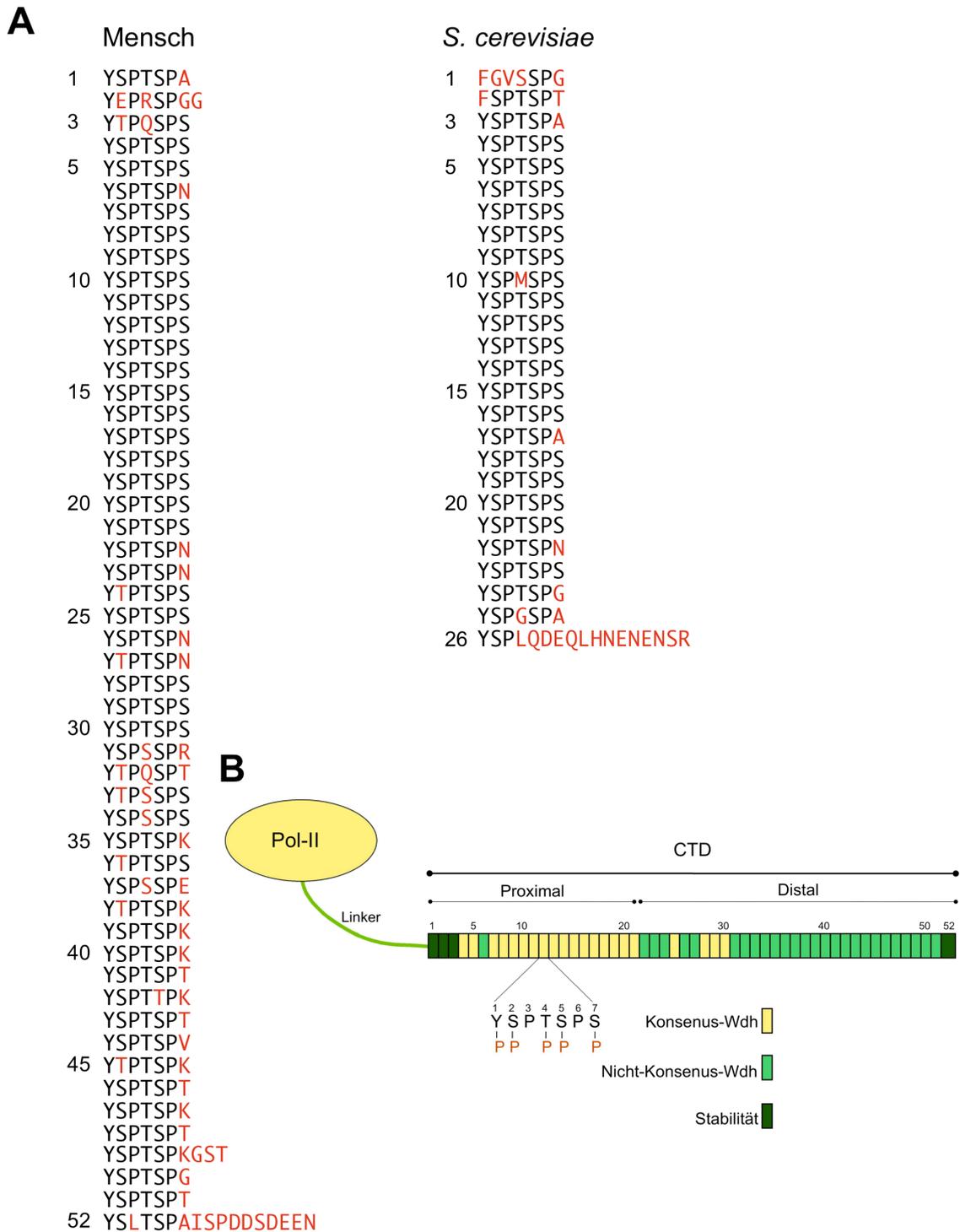


Abbildung 1: CTD-Struktur der Pol-II. (A) Aminosäuresequenz der CTD von Mensch und Hefe (*S. cerevisiae*). Abweichungen von der Konsensussequenz sind rot markiert. (B) Schematische Darstellung der CTD-Lokalisation. Die Repeats 1-21 entsprechen weitgehend der Konsensussequenz (gelb) und bilden den proximalen Abschnitt der CTD, der an den Linker anschließt. Die restlichen 31 Repeats im distalen Bereich der CTD weichen fast alle von der Konsensussequenz ab (grün). Die Sequenz einer Konsensus-Wiederholung ist exemplarisch dargestellt und die fünf potenziellen Phosphorylierungsstellen sind mit einem roten P gekennzeichnet. Für die Stabilität der Pol-II sind die Nicht-Konsensus-Wiederholungen eins bis drei sowie das Heptad 52 (dunkelgrün) wichtig.

Homozygote Mäuse mit einer Deletion von 13 Wiederholungen sind kleiner als ihre Artgenossen und weisen eine höhere neonatale Sterblichkeit auf. Dies deutet daraufhin, dass die CTD bereits für die Entwicklung der Säugetiere wichtig ist (Litington et al., 1999).

Die CTD der Säugetiere kann anhand ihrer Aminosäuresequenz in drei unterschiedliche Bereiche unterteilt werden (Abb. 1B): die Linkerregion, eine proximale CTD, die an den Linker anschließt und einen distalen Bereich der CTD. Bei den Säugetieren entsprechen die proximal zum Linker liegenden 21 Wiederholungen der Konsensussequenz, wohingegen die restlichen 31 Wiederholungen im distalen Bereich der CTD weniger stark konserviert sind. Vor allem das Serin an Position 7 ist häufig gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht (Chapman et al., 2008). In allen Wiederholungen sind die zwei Prolin-Reste konserviert und spielen eine wichtige Rolle für die Struktur der CTD. Für die Stabilität der Pol-II sind die Nicht-Konsensus-Wiederholungen eins bis drei sowie das Heptad 52 wichtig (Chapman et al., 2004). Durch genetische Manipulation der CTD in der Hefe hat die Arbeitsgruppe von John Stiller wichtige Beiträge zur Struktur-Funktions-Analyse der repetitiven Struktur der CTD machen können. Die Insertion der Aminosäure Alanin zwischen jede Heptapeptid-Sequenz ist in der Hefe letal, wohingegen Insertionen toleriert werden, wenn sie nur hinter jedem zweiten Repeat stattfinden. Die funktionelle Einheit der CTD scheint somit nicht ein einzelnes Heptapeptid zu sein, sondern ist wahrscheinlich eine Sequenz, die innerhalb einer Tandem-Wiederholung liegt (Stiller und Cook, 2004).

Während des Transkriptionszyklus wird die CTD durch eine Vielzahl von Modifikationen ständig in ihrer Struktur verändert. Die CTD dient offensichtlich als Gerüst für die Interaktion sehr unterschiedlicher Proteine, die den komplexen Prozess der Transkription und der mRNA-Reifung steuern. Bekannte Modifikationen der CTD sind Phosphorylierung, Glykosylierung, und Prolin-Isomerisierung (Egloff und Murphy, 2008). Eine weitere Modifikation wurde kürzlich mit Methylierung des Arginins in Repeat 31 beschrieben (Sims et al., 2011). In jeder Phase des Transkriptionszyklus herrschen verschiedene Phosphorylierungszustände der CTD vor, wodurch die Bindung unterschiedlicher Faktoren koordiniert werden kann und eine Regulation der Genexpression ermöglicht wird.

1.3 Der Transkriptionszyklus

Der Transkriptionszyklus der Pol-II kann in vier Phasen unterteilt werden: (1) Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes (PIC), (2) Transkriptions-Initiation, (3) Elongationsphase mit RNA-Synthese, sowie (4) Termination der Transkription. Nach der Termination kann die Pol-II in einen neuen Zyklus eintreten. Im Transkriptionszyklus wird der Phosphorylierungsstatus der CTD durch Kinasen und Phosphatasen ständig verändert, wodurch einerseits das Fortschreiten des Transkriptionszyklus und andererseits auch die zeitlich geordnete Rekrutierung der Prozessierungsfaktoren für die RNA reguliert wird (Abb. 2).

1.3.1. Initiation der Transkription

Die Initiation der Transkription von Genen durch die Pol-II wird von einer Vielzahl an Faktoren gesteuert. Eine erste wichtige Voraussetzung für die Initiation ist der freie Zugang der Pol-II zum Promotor. Chromatin-Remodellingfaktoren ermöglichen eine Auflockerung des Chromatins am Promotor und damit die Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes. Dieser Prozess wird durch basale (GTFs) wie auch aktivierende Transkriptionsfaktoren reguliert. Zusammen mit dem Mediator-Komplex wird die nicht-phosphorylierte Pol-II (Pol-IIA-Form) an den Promotor gebunden. Dabei binden zuerst die GTFs und dirigieren so die Pol-II an die richtige Stelle. Das typische Modell aus dem Lehrbuch zur Bildung eines Prä-Initiationskomplexes (PIC) beginnt mit der Bindung des TFIID, gefolgt von TFIIA, TFIIB, der Polymerase mit TFIIF und von TFIIIE, TFIIF (Buratowski et al., 1989). Die Transkriptionsstartstelle (TSS) an Promotoren von eukaryotischen Klasse II Genen befindet sich häufig innerhalb eines Pyrimidin-reichen Initiator-Elements (INR) und ungefähr 26-30 Basenpaare unterhalb einer TATA-Box mit der Konsensussequenz TATAAA. Dieses Element wird durch das TATA-Bindeprotein (TBP), einer Untereinheit von TFIID, erkannt und gebunden, wodurch ein Knick in der Promotor-DNA entsteht. Durch diese Strukturveränderung der DNA können Aktivatorproteine, die an entfernten Elementen gebunden sind, mit dem PIC in Verbindung treten. Bindeelemente für Aktivatoren können viele tausend Basenpaare entfernt liegen und die Transkription des Genlokus sowohl positiv (*Enhancer*) als auch negativ (*Silencer*) beeinflussen (Seipel et al., 1992). Die nach Bindung von TFIID leicht entwundene DNA ermöglicht dann die Bindung von TFIIB an das TFIIB-Recognition-Element (BRE), das unmittelbar neben der TATA-Box liegt. Dies führt zu einer Stabilisierung der Bindung

von TFIID mit der DNA und vervollständigt damit die Plattform für die Rekrutierung des Pol-II/TFIIF-Komplexes. Die Bindung von TFIIA dient ebenfalls der Stabilisierung der TFIID-Bindung und zusätzlich der Entfernung möglicher negativ wirkender Faktoren. Anschließend bindet die nicht-phosphorylierte Pol-II zusammen mit TFIIF an die DNA.

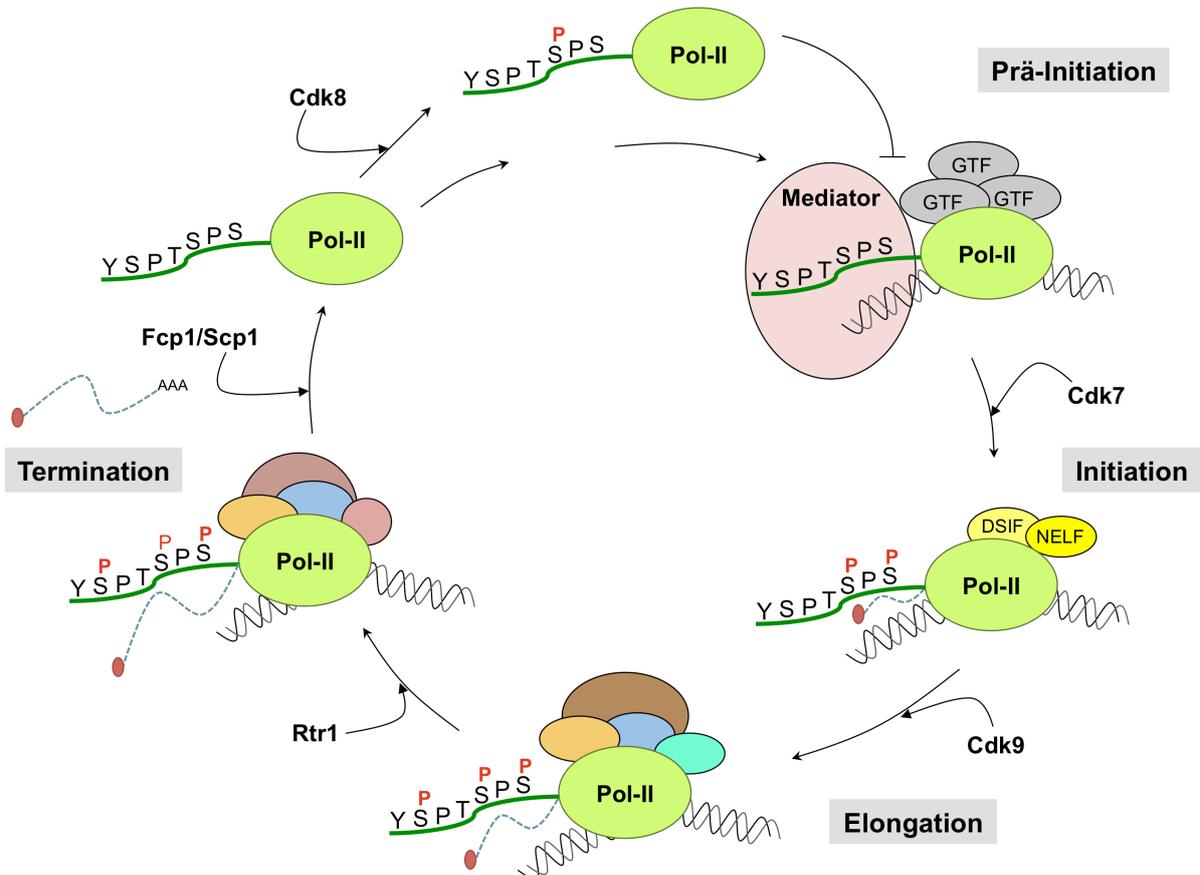


Abbildung 2: Der Transkriptionszyklus der Pol-II. Die nicht-phosphorylierte Pol-II bildet zusammen mit dem Mediator und den GTFs den Prä-Initiationskomplex (PIC). Im PIC wird die CTD der Pol-II an Serin-5 und Serin-7 durch die Kinase Cdk7 phosphoryliert (P). Die Faktoren DSIF und NELF hemmen die Elongation. Die Serin-5-Phosphorylierung der CTD führt zur Rekrutierung der Capping-Enzyme und die 5'-Cap-Struktur an der prä-mRNA (unterbrochene Linie) wird gebildet. Die Phosphorylierung an Serin-2 durch Cdk9 beendet die Hemmung der Pol-II durch die Interaktion mit NELF/DSIF und führt zur Elongation. Anschließend wird die naszierende mRNA durch den Spleißvorgang und die Polyadenylierung/Spaltung weiter prozessiert. Die Phosphatasen Rtr1 und Scp1 dephosphorylieren die CTD an Serin-5, wohingegen Fcp1 die Phosphorylierungen an den Serin-2-Resten der CTD entfernt. Bevor es zur Ausbildung des PIC kommt, kann Cdk8 die Transkription durch die Phosphorylierung der CTD an Serin-5 hemmen. Die während des Transkriptionszyklus nötigen Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren sind schematisch durch farbige Ovale dargestellt.

Der TFIID-Komplex besteht aus TBP und 10-12 TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) und spielt eine wichtige Rolle bei der Transkription, die durch Aktivatoren angeregt wurde (Komarnitsky et al., 1999). TBP bindet an die TATA-Box, TAF1 und TAF2 an das INR-Element und TAF6 sowie TAF9 an das Downstream-Promotor-Element (DPE) (Juven-Gersohn und Kadonaga, 2010).

In der späten Phase der PIC-Bildung, nach Bindung der Pol-II, kommt es zur Bindung von TFIIIE, der die Anlagerung von TFIIH steuert und dessen enzymatische Aktivität reguliert. Der TFIIH-Komplex setzt sich aus zehn Untereinheiten zusammen und enthält die zwei Helikasen XPB und XPD sowie die Cyclin-abhängige Kinase Cdk7 (in Hefe Kin28) (Yakovchuk et al., 2011). Durch die Helikaseaktivität dieses Komplexes kommt es im Bereich der TSS unter ATP-Verbrauch zur Entwindung der DNA und es entsteht ein offener Promotor-Komplex (Dvir et al., 2001; Zhovmer et al., 2010). Die generellen Transkriptionsfaktoren reichen für die effiziente Transkription von Genen aber nicht aus. Sie benötigen zusätzlich den sogenannten Mediator-Komplex, der aus mehr als 20 Proteinen besteht und mit GTFs, der Pol-II, sowie verschiedenen Koaktivatoren und Korepressoren interagiert (Kornberg, 2007). Der Mediator-Komplex ist wichtig für die basale und aktivierte Transkription und übermittelt Signale von regulatorischen Faktoren an die Pol-II (Taatjes, 2010). Der Aufbau des PIC kann durch eine frühe Phosphorylierung an den Serin-5-Resten der CTD durch die Kinase Cdk8/CyclinC des Mediators verhindert werden (Hengartner et al., 1998). Nach Bildung des PIC stimuliert der Mediator die CTD-Kinase Cdk7 des TFIIH (Max et al., 2007) und die Phosphorylierung von Serin-5 führt jetzt zu einem Übergang vom PIC über die Ablösung vom Promotor hin zur Initiation der Transkription. Die Kinase Cdk7 phosphoryliert die CTD der Pol-II nicht nur an Serin-5, sondern auch an Serin-7 (Akhtar et al., 2009; Glover-Cutter et al., 2009). Die Serin-7-Phosphorylierung spielt eine wichtige Rolle bei der 3'-Prozessierung von snRNAs und wird für die Bindung des Integrator-Komplexes an die Pol-II benötigt (Egloff et al., 2007).

Die Serin-5-Phosphorylierung der CTD führt zu einer Abspaltung des Mediators (Max et al., 2007) sowie der GTFs von der Pol-II. Nachdem die Pol-II den Promotor verlassen hat, verbleibt ein unvollständiges Gerüst aus GTFs und dem Mediator am Promotor, wodurch neue Polymerasen wieder am Promotor reinitiierten und das Gen transkribieren können (Taatjes, 2010). Kurz nach der Initiation, solange sich noch kein stabiler Elongationskomplex ausgebildet hat, neigt die Pol-II dazu einen

abortiven Transkriptionszyklus zu durchlaufen. Bei diesem Vorgang entstehen nur sehr kurze RNAs von wenigen Nukleotiden Länge (Goldman et al., 2009; Liu et al., 2011). Während der Verknüpfung der ersten fünf Nukleotide stabilisiert TFIIIB die elongierende Pol-II, indem der B-Finger von TFIIIB mit dem aktiven Zentrum der Pol-II interagiert (Bushnell et al., 2004). Erreicht das RNA-Transkript eine Länge von mehr als sieben Nukleotide, wird der B-Finger abgelöst und die Stabilität wird durch die Bindung des Linkers sowie des Cyclin-Restes des TFIIIB an die Pol-II gewährleistet (Liu et al., 2010). Die naszente RNA führt ebenfalls zu einer Stabilisierung des Transkriptionskomplexes.

Zur Verknüpfung der Nukleotide wird ein ternärer Komplex (DNA, RNA und Pol-II) benötigt (Otero et al., 1999), der ein RNA-DNA-Hybrid enthält, das ca. acht Basenpaare lang ist (Liu et al., 2011). Maximal vier Basenpaare der Template-DNA vor dem aktiven Zentrum sind entwunden. Die neu synthetisierte mRNA verlässt nach Trennung vom DNA-Template die Polymerase über eine Furche in der Nähe der CTD (Shilatifard et al., 2003). Die Brücken-Helix ist eine hoch konservierte Struktur, die aus der Untereinheit Rpb1 hervorgeht und das katalytische Zentrum der Pol-II durchläuft (Cramer et al., 2001). Im transkribierenden Komplex ist die Brücken-Helix in Kontakt mit dem Ende der DNA-RNA-Hybriden. Durch Krümmung der Helix wird die Translokation des Transkriptionskomplexes ermöglicht (Bushnell et al., 2002). Die Wechselwirkung von α -Amanitin mit bestimmten Aminosäuren in der Brücken-Helix verhindert die Translokation der Pol-II (Bushnell et al., 2002). Die Brücken-Helix ist somit nicht nur Teil des katalytischen Zentrums sondern ist auch verantwortlich für die Translokation des Komplexes. Pol-II ist trotz Verknüpfung der ersten Nukleotide und Loslösung vom Promotor noch nicht in einem stabilen Elongationsmodus.

1.3.2. Elongation der Transkription

In der frühen Elongationsphase bindet der heterodimere Komplex DSIF (*DRB-Sensitivität-induzierender Faktor*) mit den beiden Untereinheiten Spt4/5 an die Pol-II (Wada et al., 1998) und rekrutiert den negativen Elongationsfaktor NELF, was zu einem Transkriptionsarrest in Promotorbereich führt (Yamaguchi et al., 1999). Für die stabile Bindung von DSIF und NELF wird ein naszierendes Transkript von mehr als 18 Nukleotiden benötigt (Missra und Gilmour, 2010). Der Faktor DSIF bindet direkt an die transkribierende Pol-II und bildet so eine Plattform, die von NELF erkannt und gebunden wird, wobei die Bindung von NELF an die RNA wichtig für den Arrest ist

(Yamaguchi et al., 2002). Während dieses Zeitfensters werden auch die Capping-Enzyme abhängig von der Serin-5-Phosphorylierung der CTD an die Polymerase rekrutiert (Pei et al., 2002). Der Übergang von der frühen Elongationsphase in die produktive Elongation erfolgt schließlich durch den positiven Transkriptions-Elongations-Faktor B (P-TEFb). P-TEFb ist ein Heterodimer, zusammengesetzt aus der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk9 mit dem CyclinT und phosphoryliert sowohl die Serin-2-Reste der CTD, als auch NELF und die Spt5-Untereinheit des DSIF (Yamada et al., 2006; Nechaev und Adelman, 2011). Die Phosphorylierung von DSIF und NELF führt zur Dissoziation von NELF und beendet die Hemmung der Pol-II, wodurch die Polymerase in die produktive Elongationsphase übergeht (Nechaev und Adelman, 2011).

Auch diese Phase unterliegt einem hohen Grad an Regulation, da die Elongation durch die Bindung von weiteren Proteinen an die Template-DNA, durch inhibitorische Strukturen oder DNA-Läsionen blockiert werden kann. Blockierte Pol-II kann sich an diesen Stellen auf ihrer Matrize rückwärts bewegen, wodurch das 3'-Ende der RNA aus dem aktiven Zentrum entfernt wird (Cramer et al., 2000).

Der Elongationsfaktor TFIIIS reaktiviert die arretierte Pol-II durch Verstärkung der intrinsischen Nukleaseaktivität der Pol-II. TFIIIS modifiziert das aktive Zentrum der Pol-II, wodurch die Nukleaseaktivität ausgelöst wird und die Spaltung der RNA in Pol-II vollzogen wird (Kettenberger et al., 2003). Dadurch entsteht ein freies 3'-OH-Ende, das komplementär zum DNA-Template ist und von der Pol-II wieder verlängert werden kann. TFIIIS hilft so Blockaden der Elongation zu überkommen.

Cdk12 wurde kürzlich als weitere potenzielle Serin-2-spezifische CTD-Kinase in Säugetieren beschrieben (Bartkowiak et al., 2010). Folglich scheint eine zweite Kinase an der Regulation des Serin-2-Phosphorylierungsstatus der CTD während des Transkriptionszyklus beteiligt zu sein.

Je weiter die Pol-II in Richtung 3'-Ende der Gene transkribiert, desto mehr nimmt die CTD-Phosphorylierung an Serin-5-Resten ab und an Serin-2-Resten zu. Spezifische Phosphatasen können die CTD während des Transkriptionszyklus dephosphorylieren. Nach Deletion der Phosphatase Rtr1 bleibt der Serin-5-Phosphorylierungslevel während der Elongation konstant hoch. Rtr1 konnte somit als spezifische CTD-Phosphatase identifiziert werden, die während der Elongation den Serin-5-Phosphorylierungsstatus der CTD reguliert (Mosley et al., 2009).

1.3.3. Termination der Transkription

Wenn Pol-II das 3'-Ende eines Gens erreicht, beginnt die letzte Phase des Transkriptionszyklus, bestehend aus Prozessierung und Polyadenylierung der mRNA und der Termination der Transkription. Die Spaltung und Polyadenylierung sind wichtige Prozesse, um eine Degradation der mRNA zu verhindern und ihren Export ins Cytoplasma zu gewährleisten. Der Mechanismus der Termination von proteinkodierenden Genen durch Pol-II ist noch nicht vollständig verstanden, ist aber an die Polyadenylierung der mRNA gekoppelt (Buratowski, 2009). Zur Zeit werden zwei unterschiedliche Modelle für die Termination der Pol-II Transkription diskutiert, das Torpedo-Modell und das allosterische Modell.

Das Torpedo-Modell besagt, dass die naszierende RNA unterhalb des Polyadenylierungssignals geschnitten wird, wodurch eine 5'-3'-Exonuklease Zugang zum Transkript erhält und die stromabwärts befindliche RNA abbaut. Dies induziert auch die Dissoziation der Pol-II von dem DNA-Template. Nach Depletion der 5'-3'-Exonuklease Xrn2 (in Hefe Rat1) findet eine Termination nicht mehr statt (Kim et al., 2004; West et al., 2004).

Das allosterische Modell erklärt den Prozess der Termination dadurch, dass nach Transkription des Polyadenylierungssignals Konformationsänderungen im Elongationskomplex hervorgerufen werden. Die Bindung von Terminationsfaktoren oder die Ablösung eines Anti-Terminationsfaktors leiten die Dissoziation der Pol-II von der Template-DNA ein (Rosonina et al., 2006). Eine weitere Studie wiederum zeigte, dass die Faktoren Rat1 und Xrn2 zwar für den kotranskriptionellen Abbau der RNA verantwortlich sind, aber nicht die Termination auslösen. Rat1 fördert viel mehr die Rekrutierung von 3'-Prozessierungsfaktoren wie z.B. Pcf11 und beteiligt sich dadurch indirekt an der Termination (Luo et al., 2006).

Diese Beobachtung unterstützt ein weiteres Terminations-Modell, das eine Mischung aus dem allosterischen- und dem Torpedo-Modell als Erklärung für die Ereignisse an den 3'-Enden der Gene postuliert. Kurz nach der Transkription der Polyadenylierungsstelle kommt es zu einem vorübergehenden Stillstand des Elongationskomplexes und die Spaltung der naszierenden RNA einhergehend mit dem Abbau dieser RNA durch die 3'-5'-Endonuklease Xrn2/Rat1 findet statt. Xrn2/Rat1 rekrutiert Terminationsfaktoren an das aktive Zentrum der Pol-II, die zu einem Ablösen der Pol-II von der DNA führen (Rosonina et al., 2006).

Sobald die Transkription terminiert wird, löst sich die Pol-II von der Template-DNA und wird durch die spezifischen Phosphatasen Fcp1 und Scp1 (in Hefe Ssu72) dephosphoryliert. Fcp1 entfernt spezifisch die Phosphate an den Serin-2-Resten der CTD, während Scp1 die CTD an Serin-5 dephosphoryliert (Meinhart et al., 2005; Ghosh et al., 2008). Das Recycling der Pol-II ermöglicht eine neue Runde des Transkriptionszyklus, da nur nicht-phosphorylierte Pol-II (Pol-IIA) an der Bildung von PICs beteiligt ist.

Die Dephosphorylierung der CTD wird möglicherweise durch die Isomerisierung der Proline von der *cis*- in die *trans*-Konformation reguliert. Die Isomerase Pin1 isomerisiert bevorzugt Proline, wenn diesen phosphorylierte Serine oder Threonine vorausgehen (Albert et al., 1999). Die Interaktion von Pin1 mit der CTD beeinflusst den Phosphorylierungsstatus der CTD, indem Pin1 die Phosphatase Fcp1 hemmt, wodurch eine Dephosphorylierung am Ende des Transkriptionszyklus nicht möglich ist. Folglich spielt Pin1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Pol-II-Aktivität (Xu et al., 2003; Xu et al., 2007).

1.4 mRNA-Prozessierung

Der Phosphorylierungsstatus der CTD steuert nicht nur das Fortschreiten des Transkriptionszyklus, sondern auch die Rekrutierung von RNA-Prozessierungsfaktoren. Diese Faktoren sind verantwortlich für die Bildung der 5'-Cap-Struktur, das Spleißen sowie die 3'-Polyadenylierung der Transkripte. Alle drei Prozesse finden kotranskriptionell statt, wobei die CTD als Interaktionsplattform für die verantwortlichen Enzyme dient. Nach Synthese der ersten 20 bis 30 Nukleotide wird die naszierende prä-mRNA am 5'-Ende modifiziert.

Die Phosphorylierung der CTD an Serin-5-Resten führt zur Rekrutierung der Capping-Enzyme Triphosphatase, Guanylyltransferase und Methyltransferase, die bei der Bildung des 7-Methylguanosin-Caps zusammenwirken (McCracken et al., 1997; Ghosh et al., 2011; Schwer und Shuman, 2011). Wahrscheinlich können nur Transkripte mit einem Cap *in vivo* elongiert werden. Erst wenn die Cap-Struktur vollständig ausgebildet ist, kommt es zur Bildung eines stabilen Elongationskomplexes (Orphanides und Reinberg, 2002; Pei et al., 2003).

Das Spleißen entfernt Introns aus der prä-mRNA und dient der Bildung von reifer RNA. Die Komponenten des Spleißosoms binden direkt an die hyperphosphorylierte CTD und die Introns werden in der Regel kotranskriptionell entfernt (Hirose et al.,

1999). In höheren Organismen werden viele Transkripte auch alternativ gespleißt. Dieser Vorgang ermöglicht die Herstellung multipler Transkripte von ein und demselben Gen, indem unterschiedliche Spleißstellen genutzt und bestimmte Exons übersprungen werden können. Alternatives Spleißen findet in 65% bis 90% der humanen Gene statt (Munoz et al., 2010) und ermöglicht die Produktion einer Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen aus einem verhältnismäßig kleinen Genpool. Nach Transkription der Polyadenylierungsstelle bindet der 3'-Prozessierungs-Komplex an die Serin-2-phosphorylierte CTD und spaltet sowie polyadenyliert die mRNA (Hirose und Manley, 1998; Ahn et al., 2004). Mit diesem Schritt ist die Reifung der mRNA weitgehend abgeschlossen und sie kann ins Cytoplasma transportiert werden.

1.5 Chromatin ist eine natürliche Barriere für Transkription

Eine wichtige Voraussetzung für die Transkription von Genen ist ein freier Zugang der Pol-II zum DNA-Template. Es muss sichergestellt sein, dass dieser Zugang nicht durch die Chromatinstruktur im Promotorbereich verhindert wird. Die kleinste Einheit von Chromatin ist das Nukleosom, das aus jeweils zwei Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 gebildet wird, umwickelt von 147 Basenpaaren DNA (Kouzarides, 2007). Nukleosomen stellen nicht nur für die Initiation der Transkription ein Hindernis dar. Auch während der Elongation sind Histone ein ständiges „Hindernis“, das die Pol-II überkommen muss. Verschiedene posttranslationale Modifikationen der Histone scheinen mit bestimmten Phasen der Transkription verknüpft zu sein. Histon-Schwänze können reversibel eine Vielzahl unterschiedlicher Modifikationen tragen, wie zum Beispiel Phosphat-, Acetyl-, Ubiquitin- oder Methyl-Reste (Kouzarides et al., 2007; Kim und Buratowski, 2009). Histon-Modifikationen steuern die Rekrutierung einer großen Bandbreite an Proteinen ans Chromatin.

Damit der Pol-II während der Transkription der Weg durch das Chromatin und an den Nukleosomen vorbei erleichtert wird, müssen Chromatin-Remodelling-Komplexe rekrutiert und die Histone acetyliert sowie an H2B monoubiquitinyliert werden (Abb. 3; Pavri et al., 2006). Histon-Acetyltransferasen werden an transkribierte Gene rekrutiert und acetylieren die vor der Pol-II befindlichen Histone. Die Histon-Acetyltransferase p300 interagiert mit der nicht-phosphorylierten CTD der Pol-II, was ihre Rekrutierung in die Nähe der Initiationsstellen begünstigen könnte.

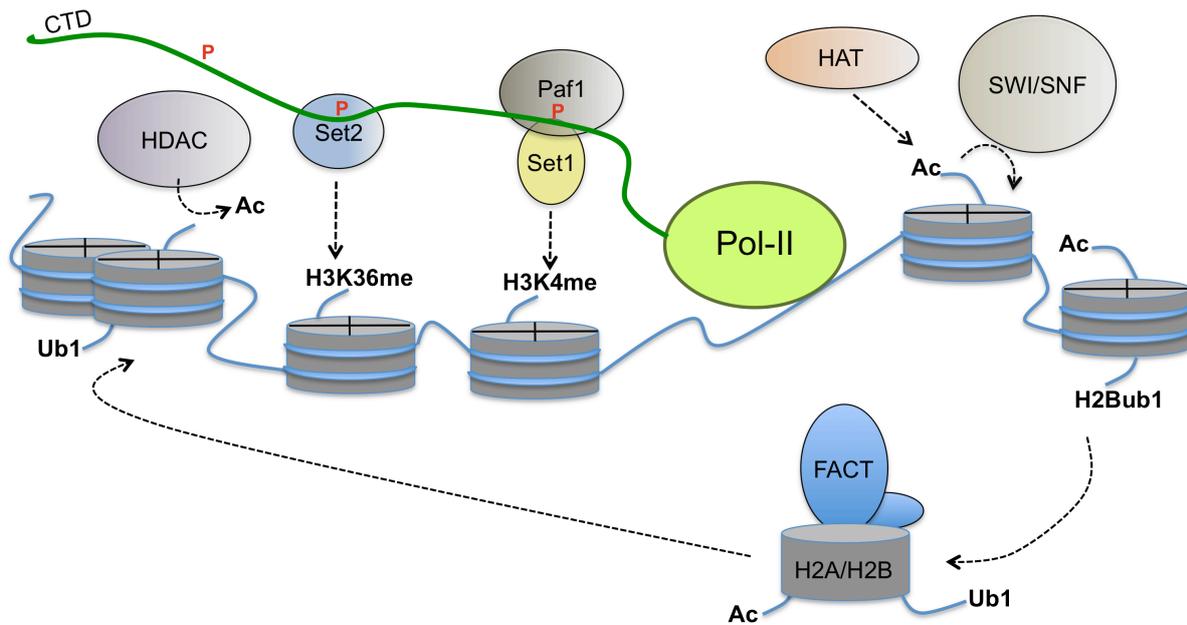


Abbildung 3: Chromatinmodifikationen während der Transkription. Zu Beginn der Transkription wird die Pol-II an Serin-5-Resten der CTD durch Cdk7 phosphoryliert. Der Paf1-Komplex bindet an Serin-5-phosphorylierte CTD der Pol-II und rekrutiert die Histon-Methyltransferase Set1, die im 5'-Bereich der Gene die Histonmodifikation H3K4 Methylierung einführt. H3K4 Trimethylierung in Histonen nahe der Transkriptionsstelle wirkt aktivierend auf die Transkription und ist ein Zeichen für aktive Promotoren. Während der Elongation wird die CTD an Serin-2 durch Cdk9 phosphoryliert. Set2 bindet direkt an Serin-2/Serin-5-phosphorylierte CTD und führt unterhalb des Transkriptionsstarts die Histonmodifikation H3K36 Methylierung ein. Während der Transkription acetylieren Histon-Acetyltransferasen (HAT) die Histone vor der Pol-II, wodurch Chromatin-Remodelling-Komplexe (z.B. SWI/SNF) rekrutiert werden, die die Nucleosomen vor dem Transkriptionskomplex entfernen. Während der Elongation stimuliert H2Bub1 FACT den H2A/H2B-Dimer aus den Nucleosomen zu entfernen. Die entfernten Histone werden nach der Transkription der Gene mittels FACT reassembliert und durch Histon-Deacetylasen (HDAC) deacetyliert. Die Chromatin-modifizierenden Faktoren sind schematisch durch farbige Ovale dargestellt.

Eine weitere Histon-Acetyltransferase PCAF interagiert dagegen mit der hyperphosphorylierten Pol-II, wodurch vielleicht die Elongation durch das Chromatin erleichtert wird (Cho et al., 1998). Acetylierte Histon-Schwänze führen zur Rekrutierung von Chromatin-Remodelling-Komplexe wie z.B. SWI/SNF (in Mensch SW1/SNF) oder RSC, die die Nucleosomen vor dem Transkriptionskomplex entfernen und dadurch die Transkription der Pol-II durch das Chromatin ermöglichen (Spain und Govind, 2011; Kwon et al., 1994). Die Acetylierung von Histonen wird folglich mit transkriptionell aktiven Genen in Verbindung gebracht und an Promotor-

Regionen von aktiv transkribierten Genen tritt hauptsächlich die Acetylierung des Lysins an Position 9 von Histon 3 (H3K9) auf (Kim und Workmann, 2010).

Die entfernten Histone scheinen den Transkriptionskomplex nicht zu verlassen, sondern setzen sich hinter der Pol-II wieder zu neuen Nukleosomen zusammen. Die anschließende Deacetylierung der reassemblierten Nukleosomen durch Histon-Deacetylasen verhindert eine erneute Interaktion mit Chromatin-Remodelling-Komplexen. Dieser Vorgang soll die kodierenden Regionen aktiv transkribierter Gene vor DNA-Schäden schützen (Spain und Govind, 2011).

Während der fortschreitenden Elongation stimuliert die H2B Monoubiquitylierung die Aktivität des dimeren Histon-Chaparons FACT, der das H2A/H2B-Dimer aus den Nukleosomen vor der Pol-II entfernt, wodurch die Nukleosomen von der DNA dissoziieren und damit der Pol-II den Weg durch das Chromatin erleichtert (Reinberg und Sims, 2006). FACT ist auch an der Reassemblierung der Histone nach der Transkription von Genen beteiligt (Workman, 2006). Der Chromatin-Remodelling-Komplex SWI/SNF und das Histon H2A/H2B-Chaparon FACT begleiten die Pol-II und ermöglichen eine Transkriptions-gekoppelte Räumung und Neuordnung der Histone (Workman, 2006).

Interessanterweise ist die Transkription des Chromatins eng an den Phosphorylierungsstatus der CTD gekoppelt (Abb. 3; Berger, 2007; Egloff und Murphy, 2008). Zu Beginn der Transkription wird die CTD an Serin-5-Resten durch Cdk7 und während der Elongation an Serin-2 durch Cdk9 phosphoryliert. Die Histon-Methyltransferasen Set1 und Set2 werden in der Hefe während der Transkription durch Serin-5- bzw. Serin-2/Serin-5-Phosphorylierung der CTD rekrutiert. Set1 methyliert H3K4 hauptsächlich am 5'-Ende von Genen, während Set2 H3K36 hauptsächlich in Richtung des 3'-Endes der Gene methyliert (Egloff und Murphy, 2008). Die Methyltransferase Set1 interagiert über den Paf1-Komplex mit der Serin-5-phosphorylierten CTD (Hampsey und Reinberg, 2003), wohingegen Set2 direkt an die CTD bindet, wenn eine Serin-2/Serin-5-Doppelphosphorylierung vorliegt (Kizer et al., 2005). Die Set1-abhängige H3K4 Methylierung kann auch zur Rekrutierung von weiteren Transkriptions-aktivierenden Komplexen führen. Zu diesen gehört der Chromatin-Remodelling-Komplex NURF, der über die PHD-Domäne spezifisch H3K4me3 erkennt und zu einer Dekondensation des Chromatins beiträgt (Wysocka et al., 2006; Berger, 2007). Die Trimethylierung von H3K4 in Histonen nahe der Transkriptionsstelle wirkt aktivierend auf die Transkription, wohingegen H3K4

Dimethylierung den Set3-Histon-Deacetylase-Komplex an 5'-Bereiche transkribierter Gene rekrutiert (Kim und Buratowski, 2009). Set2-abhängige H3K36 Methylierung in Histonen im 3'-Bereich der Gene wirkt aktivierend auf die Transkription und dient auch als Signal für die Rekrutierung der Histon-Deacetylasen HDAC6 (in Hefe Rpd3-Komplex) (Wang et al., 2009). Die Methylierung von H3K4 und H3K36 könnte somit auch an der Reassemblierung der Nukleosomen beteiligt sein.

Der Chromatinstatus des transkribierten DNA-Templates und der Phosphorylierungsstatus der CTD beeinflussen sich folglich gegenseitig. Die wechselseitigen Beziehungen zwischen den Chromatin-Modifikationen und dem Transkriptionskomplex verdeutlichen die Komplexität der Regulation der Genexpression.

1.6 Aufgabenstellung

Die CTD der humanen RNA-Polymerase II besteht aus 52 Wiederholungen der Konsensussequenz $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$. Diese Heptapeptid-Sequenz enthält fünf potenzielle Phosphorylierungsstellen ($Y_1S_2PT_4S_5PS_7$). Gegen Peptide, die an einzelnen Aminosäuren phosphoryliert waren, wurden in unserem Labor monoklonale Ratten-Antikörper hergestellt. Die Spezifität und Bindungsbedingungen dieser Antikörper wurden eingehend getestet (Chapman et al., 2007; Heidemann, 2010). Diese monoklonalen Antikörper ermöglichen den Nachweis der Phosphorylierung der fünf Aminosäuren *in vivo*. Während die Phosphorylierung der Serin-2-, Serin-5- und Serin-7-Reste des Heptads in Bezug auf den Zeitpunkt des Auftretens und der Funktion bereits gut charakterisiert ist, ist über die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin-4 bis jetzt nichts bekannt. In dieser Arbeit wird die Phosphorylierung von Threonin-4 erstmals näher beschrieben.

Das Ziel der Arbeit war die Funktion der Phosphorylierung der Aminosäure Threonin-4 näher zu untersuchen. Welche Rolle spielt diese Phosphorylierung während des Transkriptionszyklus und welche Enzyme sind für die Etablierung dieser Phosphorylierung verantwortlich?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1. Chemikalien

Adenosine 5'-Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
α -Amanitin	AppliCem GmbH, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ciprobay 400	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Dimethylsulphoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
DMEM Medium 41966	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Advance blocking agent	GE-Healthcare, München
Ethylendiamine-tetraacetic acid (EDTA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Ethylenglycol-tetraacetic acid (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol 86%	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Harnstoff 99,5%	Plusone, Pharmacia Biotech, Uppsala
HEPES	MP Biomedicals Inc., Eschwege
Immersol 518F	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin 200mM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt

Milchpulver	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Mounting-Medium	Dako GmbH, Hamburg
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biochemicals Inc., Ohio
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Neomycin (G 418)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Nocodazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nonident P40 (NP40)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
OPTI-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
PIPES	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
Polyacrylamid 30% (PAA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
RPMI Medium 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Sparfloxacin	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Sodium azide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Tetracyclin	Promega Corp., Wisconsin, USA
Tris (hydroxymethyl)aminomethanol	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
0,5% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 3% (w/w)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.2. Antikörper

Primärantikörper

Alle monoklonalen CTD-Antikörper sowie die Antikörper gegen Nog1, Pes1 und WDR43 wurden von E. Kremmer (Helmholtz Zentrum München) hergestellt (Hoelzel et al., 2005) und als Überstand erhalten. Der monoklonale Antikörper 8WG16 erkennt mehrmals die unphosphorylierte CTD der großen Untereinheit der RNA-

Material und Methoden

Polymerase II. Der monoklonale Antikörper Pol3.3. erkennt ein konserviertes Epitop in der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II außerhalb der CTD (Ursprünglich hergestellt von E.K. Bautz, Universität Heidelberg. Erhalten als Überstand von E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München).

Zielprotein	Name	Spezies	Quelle
α -Tubulin	T6199	Maus	Sigma-Aldrich GmbH
Anti-HA-High Affinity	3F10	Ratte	Roche Diagnostics GmbH
AffiniPure Anti-Ratte	312-005-046	Kaninchen IgG, FC _γ	Dianova GmbH
CTD nicht-phospho	1C7	Ratte	E. Kremmer (in dieser Arbeit)
CTD Ser5-P	3E8	Ratte	Chapman et al., 2007
CTD Ser2-P	3E10	Ratte	Chapman et al., 2007
CTD Ser7-P	4E12	Ratte	Chapman et al., 2007
CTD Thr4-P	6D7 (IgG2b)	Ratte	E. Kremmer (in dieser Arbeit)
CTD Thr4-P	1G7 (IgG2a)	Ratte	E. Kremmer (in dieser Arbeit)
CTD K7-me	1F7	Ratte	E. Kremmer
γ -Tubulin	T6557	Maus	Sigma-Aldrich GmbH
Kaninchen IgG	Sc-2027	Kaninchen	Santa Cruz, INC
Nog1	1D8	Ratte	Rohrmoser et al., 2007
Pes1	8E9	Ratte	Hoelzel et al., 2005
PIk1	Ab47867	Kaninchen	Abcam plc
PIk3	D14F12	Kaninchen	CellSignaling Technology
Pol-II N-20	Sc-899	Kaninchen	Santa Cruz, INC
Pol-II Rpb1	Pol3.3.	Maus	Chapman et al., 2007
Rpb1-CTD	8WG16	Maus	E. Kremmer
WDR43	1B8	Ratte	Hoelzel et al., 2005

Sekundärantikörper

Alexa Fluor 680 Goat α -Rat IgG (H+L)	Invitrogen, Karlsruhe
IR Dye 800 CW α -Mouse IgG (H+L)	Rockland Inc, Rockland
α -IgG2a, HRP-gekoppelt (TIB173)	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München
α -IgG2b, HRP-gekoppelt (TIB174)	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München
α -IgG Kaninchen, HRP-gekoppelt	Promega Corp., Wisconsin, USA
α -IgG Maus, HRP-gekoppelt	Promega Corp., Wisconsin, USA
α -IgG Ratte, HRP-gekoppelt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Alexa Fluor 488 goat α -Mouse IgG (H+L)	Molecular Probes, Eugene, USA
α -Kaninchen IgG F(ab) ₂ Fragment-FITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cy3-goat α -Rat IgG (H+L)	Dianova GmbH, Hamburg
Cy5-goat α -Mouse IgG (H+L)	Dianova GmbH, Hamburg

2.1.3. Peptide

Die CTD-Peptide wurden von Dr. Hans-Richard Rackwitz synthetisiert (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg). Die Aminosäuresequenzen der Di-Heptapeptide sind in Abbildung 5 dargestellt.

2.1.4. Plasmide

Die Strategie zur Herstellung und Klonierung der verwendeten Plasmide wurde von Rob Chapman entwickelt (Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2007). Zur Herstellung der synthetischen CTD-Konstrukte wurde pUC19-CTD mit den Enzymen *NheI* und *StyI* geschnitten und ein synthetischer Linker mit der Sequenz von drei Heptapeptiden mit der jeweiligen Mutation eingeführt. 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. Diese Mutanten wurden entweder in einen Tetracyclin-regulierten Vektor (Chapman et al., 2004) oder zur Expression in HEK293-Zellen in den konstitutiven Expressionsvektor pSTC-TK HA Pol II LS* (Gerber et al., 1995) eingefügt.

2.1.5. SiRNA-Sequenzen

Zielprotein	Name	Sequenz	Quelle
Luciferase	siLuc	5'-CGTACGCGGAATACTTCGAdTdT-3'	MWG/Eurofins
Pes1	siPes1	5'-AGGTCTTCCTGTCCATCAAAdTdT-3'	Rohrmoser et al., 2007
Plk3	siPlk3-1	5'-CGGCCTCATGCGCACATCCdTdT-3'	Bahassi et al., 2004
Plk3	siPlk3-2	5'-CTGCGTGACAGTCCCAGACdTdT-3'	Bahassi et al., 2004
Plk1	siPlk1	5'-AGACCTACCTCCGGATCAAAdTdT-3'	Hauptenthal et al., 2007

2.1.6. Puffer und Lösungen

Crosslinking-Lösung

11% Formaldehyd
100mM NaCl
1mM EDTA, pH 8,0
0,5mM EGTA, pH 8,0
50mM Hepes, pH 7,8
ad H₂O

DAPI-Lösung

0,05% (w/v) DAPI
in PBS

ECL-Blocking-Reagenz

99,9% (v/v) PBS
0,1% (v/v) Tween 20
2% (w/v) ECL-Blocking-Pulver

Material und Methoden

Elutions-Puffer (EP)	50mM Tris, pH 8,0 10mM EDTA, pH 8,0 1% SDS
IP-Lyse-Puffer	50mM Tris/HCl, pH 8,0 150mM NaCl 1% NP-40 1x Proteaseinhibitor 1x Phosphataseinhibitor ad H ₂ O
Kinase-Puffer A	20mM Tris/HCl, pH 7,4 20mM NaCl 10mM MgCl ₂ 1μM DTT 2μM ATP
Kinase-Puffer B	50mM HEPES, pH 7,8 100mM KCl 10mM MgCl ₂ 200μM EGTA 100μM EDTA 1mM DTT 200μM ATP 1μg BSA
Lämmli-Auftragspuffer (2x)	2% SDS 100mM DTT 10mM EDTA 20% Glycerol 60mM Tris/HCl; pH 6,8 0,01% Bromphenolblau 8M Harnstoff

Material und Methoden

Lämmli-Auftragspuffer (6x)	9% SDS 375mM Tris/HCl ; pH 6,8 9% β -Mercaptoethanol 50% Glycerin 0,06% Bromphenolblau 8M Harnstoff
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
PBS/Tween	99,9% (v/v) PBS 0,1% (v/v) Tween 20
PBS+	1% (w/v) BSA 0,15% (w/v) Glycin in PBS
2xPHEM-Puffer (pH 7,0)	18,4g PIPES 6,5g HEPES 3,8g EGTA 0,99g MgSO_4 ad 500ml dH_2O pH-Einstellung mit KOH
PBS/Triton	0,15%/ 0,1% (v/v) Triton in PBS
37% PFA	1,85g PFA 3,5ml dH_2O 10 μ l 10M KOH
2% PFA	5,4ml 3,7% PFA 2,3ml PHEM 2,3ml dH_2O

Material und Methoden

Lyse-Puffer (LP1)	50mM Hepes 140mM NaCl 1mM EDTA, pH 8,0 10% Glycerol 0,75% NP40 0,25% Triton X-100
Lyse-Puffer 2 (LP2)	200mM NaCl 1mM EDTA, pH 8,0 0,5mM EGTA, pH 8,0 10mM Tris, pH 8,0 ad H ₂ O 1x Proteaseinhibitor 0,2mM PMSF 1µg/ml Pepstatin in EtOH
Lyse-Puffer 3 (LP3)	1mM EDTA, pH 8,0 0,5mM EGTA, pH 8,0 10mM Tris, pH 8,0 100mM NaCl 0,1% Na-Deoxycholate 0,5% N-Lauroylsarcosine ad H ₂ O und Inhibitoren wie L2
RIPA-Puffer	50mM Hepes, pH 7,6 500mM LiCl 1mM EDTA, pH 8,0 1% NP40 0,7% Na-Deoxycholate ad H ₂ O und Inhibitoren wie L2
TE (Tris-EDTA)	10mM Tris/HCl, pH 8,0 1mM EDTA, pH 8,0

Material und Methoden

2xTris/SDS pH 8,8	90,72g Tris/Base 10ml SDS 20% ad 1l ddH ₂ O pH-Einstellung mit HCl
2xTris/SDS pH 6,8	30,24g Tris/Base 10ml SDS 20% ad 1l ddH ₂ O pH-Einstellung mit HCl
SDS-PAGE Trenngel (6,5%)	4,3ml PAA 30% 10ml 2xTris/SDS pH 8,8 5,5ml H ₂ O 167µl APS 17µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (8%)	5,3ml PAA 30% 10ml 2xTris/SDS pH 8,8 4,5ml H ₂ O 167µl APS 17µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (10,5%)	7ml PAA 30% 10ml 2xTris/SDS pH 8,8 2,8ml H ₂ O 167µl APS 17µl TEMED
SDS-PAGE Sammelgel (3%)	1,5ml PAA 30% 7,5ml 2xTris/SDS pH 6,8 5,9ml H ₂ O 90µl APS 20µl TEMED

Material und Methoden

SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	30,2g Tris/Base 144g Glycin 5ml SDS 20% ad 1l H ₂ O
Western-Transferpuffer (10x)	30,2g Tris/Base 144g Glycin 5ml SDS 20% 200ml Methanol ad 1l H ₂ O
Western-Blocking-Reagenz	99,9% (v/v) PBS 0,1% (v/v) Tween 20 5% (w/v) Milchpulver

2.1.7. Zelllinien

H1299:	Lungenkarzinom-Zelllinie, adhären, p53 negativ
HeLa:	Zervixkarzinom-Zelllinie, adhären
HEK293:	(<i>Human Embryonic Kidney</i>), ursprünglich aus embryonalen Nieren
NIH3T3:	embryonale Mausfibroblasten, adhären
Raji:	Burkitt-Lymphom-Zelllinie, Suspensionszellen, EBV positiv
U2OS:	Osteosarkom-Zelllinie, adhären, p53 positiv

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

96-Lochplatte	Nunc GmbH, Wiesbaden
Cryovials 1,5ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland
ECL TM -Kit	GE-Healthcare, München
Falcon Reaktionsgefäße 15ml	Becton Dickinson Labware
Falcon Reaktionsgefäße 50ml	Becton Dickinson Labware
Falcon-Multiwell (6- und 12-well)	Becton Dickinson Labware
Fugene ^R HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Penzberg
Gel-Blotting-Papier GB003	Schleicher&Schuell, Deutschland

Material und Methoden

Hybond-ECL; Nitrocellulose-Membran	GE-Healthcare, München
Hyperfilm ECL	GE-Healthcare, München
Objektträger	Menzel-Gläser, Deutschland
Oligofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
PCR-Purification-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pipettenspitzen D1000, D200, D10	Gilson, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen gestopft, Art 1000-10	MolecularBio-Products, San Diego
Poly-Prep-Slides	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein-A-Sepharose-Beads	GE-Healthcare, München
Protein-G-Sepharose-Beads	GE-Healthcare, München
Protein-Marker pageruler plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Zellkulturflaschen 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 250ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 650ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (Ø 10cm und 15cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.9. Geräte

Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, USA
Biofuge 13	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Bio-Rad PowerPac 200/300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Konfokal-Mikroskop Leica LSCM SP2	Leica Microsystem GmbH, Wetzlar
Cytospin 2	Shandon Southern Products Ltd, UK
Electrophoresis Power Supply	PeqLab GmbH, Erlangen
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 54336	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Flow-Hood-Sicherheitswerkbank	BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	GLW mbH, Würzburg
Gefrierschrank -20°C	Siemens, München

Material und Methoden

GS-Gene Linker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hypercassette	GE-Healthcare, München
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Kühlschrank	Siemens, München
Megafuge 2.0	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
M23 Magnetprüher	GLW mbH, Würzburg
Misonix 4000	Misonix Inc, USA
Multi-Calimatic pH-Meter	Knick, Berlin
Odyssey Infrared Imaging System	Odyssey LI-COR, Nebraska, USA
Optimax X-Ray Film Processor	Protec GmbH+CoKG, Oberstenfeld
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Pipetman (1000,200,20,10,2)	Gilson, Middleton, USA
SDS-PAGE Laufkammer	GE-Healthcare, München
Sonicator	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Stuart Rollermixer SRT 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RTCA Analyzer	Roche Diagnostics, Penzberg
RTCA SP Station	Roche Diagnostics, Penzberg
RTCA Control unit 1.1	Roche Diagnostics, Penzberg
Telaval 31 Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Vortexer Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH, Ismaning
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

2.1.10. Software

Adobe Photoshop CS 8.0	Adobe Systems, Mountain View, USA
Adobe Reader 7.0	Adobe Systems, Mountain View, USA
AIDA V 3.20	http://aida.freehep.org/
ImageJ 1.37V für Mac	Wayne Rasband, Maryland, USA
Leica-TCS 2.61	Leica Microsystems GmbH, Hamburg
OpenLab 3.0.8	Improvision, Coventry, England
Openlab Demo 5.01	Improvision, Coventry, England
Word, Excel, Powerpoint für MAC V 12.2.0	Microsoft, Washington, USA
Microsoft Excel 2008 für MAC V 12.2.0	Microsoft, Washington, USA
Microsoft Powerpoint 2008 für MAC V 12.2	Microsoft, Washington, USA

2.2 Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung der Zellen

Adhärente Zellen

Die humanen Zelllinien HeLa, H1299, U2OS und HEK293 sowie die embryonalen Mausfibroblasten NIH3T3 wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 8% (5% bei HEK293) CO₂ unter sterilen Bedingungen in DMEM-Medium (10% FCS, 100U Penicillin/ml, 100µg Streptomycin/ml und 2mM L-Glutamin) kultiviert. Für ein optimales Wachstum wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70% 1:5 mit frischem Medium gesplittet.

Suspensionszellen

Die Wildtyp- und die stabil-transfizierten Raji-Zellen wurden bei 37°C in einer 5% CO₂-haltigen, wasserdampfgesättigten Atmosphäre in RPMI-Medium (10% FCS, 100U Penicillin/ml, 100µg Streptomycin/ml und 2mM L-Glutamin) in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium der transfizierten Zelllinien enthielt zusätzlich 0,1µg/ml Tetracyclin sowie 1mg/ml G418. Für ein optimales Wachstum wurden die Zellen alle drei Tage 1:3 mit frischem Medium gesplittet. Um die Expression der rekombinanten RNA-Polymerasen zu induzieren, musste Tetracyclin ausgewaschen werden. Dazu wurden die Zellen jeweils bei 1200rpm für 4min abzentrifugiert und anschließend viermal mit 30ml DMEM/1% FCS für 15min gewaschen, bevor die Zellen wieder in Wachstumsmedium resuspendiert wurden. 24h nach Induktion wurde die endogene Pol-II durch Zugabe von α -Amanitin (2,5µg/ml) gehemmt. Das Crosslinken der DNA für die ChIP-Seq-Analysen erfolgte 48h nach Behandlung mit α -Amanitin. Die Proteinextrakte wurden ebenfalls 48h nach α -Amanitin-Behandlung vorbereitet.

2.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellzahl in einem bestimmten Volumen zu bestimmen, wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet und 40µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung (w/v in PBS) gemischt. Die toten Zellen nehmen diesen Farbstoff über ihre poröse Membran auf und können

somit von den farblosen, lebenden Zellen unterschieden werden. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach Auszählung von vier Großquadraten ($c[\text{Zellen/ml}] = \text{Mittelwert der Zellen pro Großquadrat} \cdot 10^4$).

2.2.1.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zur Aufbewahrung wurden 1×10^7 Zellen bei 1200rpm für 4min abzentrifugiert, das Zellpellet mit PBS gewaschen, in 1ml Einfriermedium (10% DMSO und 90% FCS) aufgenommen und in 1,5ml Cryovials überführt. Um eine Schockgefrierung der Zellen zu vermeiden, wurden die Cryovials mit einigen Lagen an Zellstoff umwickelt und für einige Tage bei -80°C gelagert, bevor die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgte. Die Kultivierung der eingefrorenen Zellen erfolgte durch kurzes Erwärmen bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen sofort in 15ml frisches Medium überführt und bei 1200rpm für 4min abzentrifugiert, um das schädliche DMSO zu entfernen. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und das Zellpellet in Medium mit 20% FCS aufgenommen.

2.2.2. Western-Analyse

2.2.2.1. Lyse der Zellen

Adhärente Zellen wurden in Zellkulturschalen oder Flaschen bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und entweder direkt von der Platte mit 2xLämmli-Puffer lysiert (250 μl pro 10cm Zellkulturschale) oder abtrypsinisiert und ausgezählt (5×10^5 Zellen). Die Raji-Suspensionszellen wurden ebenfalls ausgezählt und das entsprechende Volumen für 5×10^5 Zellen in Eppendorfgefäßen für 4min bei 1200rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in dem restlichen PBS resuspendiert und in 100 μl 2xLämmli-Puffer lysiert. Alle Proben wurden schnell auf- und abpipettiert, bis die Konsistenz dünnflüssig war und anschließend wurden die Lysate bei 95°C für 5min aufgekocht. Die Proben wurden bei -20°C weggefroren oder direkt auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.2.2.2. SDS-PAGE und Transfer

Die Lysate wurden dreimal mit je 10 Stößen sonifiziert und anschließend 3min bei 95°C aufgekocht. Die so vorbereiteten Proteinproben wurden 3min bei 13000rpm

abzentrifugiert und je 20µl pro Geltasche aufgetragen. Die Proteine wurden für ca. 2,5h bei 30mA pro Gel aufgetrennt. Der Transfer auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 450mA für 90min. Anschließend wurden die Membranen für 60min in Western- oder ECL-Blocking-Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden in 50ml Falcon-Röhren überführt und mit dem entsprechend, in 5ml Western-Blocking-Reagenz, verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Die Primärantikörper-Überstände wurden 1:10 und die kommerziellen Antikörper nach Anleitung verdünnt. Für die Primärantikörper 1F5 (α K7-me), 6D7 (α Thr4-P) und 1G7 (α Thr4-P) erfolgte das Blocken und Verdünnen der Antikörper in ECL-Blocking-Reagenz. Danach wurden die Membranen dreimal 5min mit 1xTBST zur Entfernung der Primärantikörper gewaschen und für 60min bei Raumtemperatur mit den HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern, die in Western-Blocking-Reagenz verdünnt wurden, auf einem Roller inkubiert. Darauf folgte wiederum ein dreimaliges Waschen der Membranen mit 1xTBST und ein letzter Waschschrift mit H₂O. Die Membranen wurden dann mit einem 1:1-Gemisch der beiden ECL-Reagenzien überschichtet und ein Film aufgelegt. Die Quantifizierung der Signal-Intensitäten der Antikörper wurde mithilfe des AIDA-Programms durchgeführt. Alternativ wurden die Signale auf den Membranen mit dem Odyssey-Licor-Gerät ausgelesen. Hierzu wurden die Membranen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern für 90min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend feucht auf das Odyssey-Licor-Gerät gelegt und dort eingelesen.

2.2.3. Zellproliferations-Assay

Für die transiente Transfektion der rekombinanten Polymerasen wurden 5000 HEK293-Zellen pro 96-Well in einem Volumen von 150µl DMEM-Medium ausplattiert. 24h später wurden die Zellen mit 2µg Plasmid-DNA pro 6µl Transfektions-Reagenz transfiziert. Nach weiteren 24h wurde die endogene Pol-II durch Zugabe von α -Amanitin in einer finalen Konzentration von 2,5µg/ml gehemmt. Die Zellproliferation wurde während und nach der Transfektion und des chemischen Knockouts der endogenen Pol-II mittels des xCELLigence-Systems gemessen.

2.2.4. Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Methode der Immunfluoreszenz wurden zunächst Deckgläser in 6-Loch-Platten gelegt und 90sec im GS-Genelinker mit UV zur Sterilisierung bestrahlt. Anschließend wurden pro Glasplättchen 2×10^5 Zellen ausplattiert und über Nacht bei 37°C , 8% CO_2 kultiviert. Die Fixierung und Inkubation der Zellen mit den Primär- und Sekundärantikörpern wurde wie folgt durchgeführt:

- Zellen kurz mit PBS waschen
- Fixierung der Zellen für 5min mit 2% PFA oder 3,7% PFA
- kurz mit PBS waschen
- dreimal 5min mit 0,15% Triton X-100 auf Schwenker permeabilisieren
- Blocken der Zellen für dreimal 10min mit PBS+ auf Schwenker
- Inkubation der fixierten Zellen mit den Primärantikörpern (Pol3.3. und 8WG16 (1:10), alle phosphorylierungsspezifischen Antikörper unverdünnt und Plk1, Plk3, α -Tubulin sowie γ -Tubulin (1:1000))
- 5min mit PBS waschen
- 10min mit 0,15% Triton X-100 permeabilisieren
- 5min mit PBS waschen
- 7min mit PBS+ blocken
- Sekundärantikörper in 150 μl PBS+ verdünnen (Cy3: 1:300, Cy5: 1:500, Alexa-Fluor 488: 1:400 und FITC: 1:25) und die fixierten Zellen in einer feuchten Kammer für 45min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.

Anschließend wurde bei schwachem Licht gearbeitet, um ein Ausbleichen der fluoreszenzmarkierten Präparate zu vermeiden:

- Zellen zweimal 5min mit 0,15% Triton X-100 waschen
- zweimal 7min mit PBS waschen
- Inkubation für 2min in DAPI-Lösung (1mg/ml, 1:10000)
- zweimal 2min in PBS waschen
- ein Tropfen Mounting-Medium pro Deckglas, bevor die Proben auf Objektträger gelegt und mit Nagellack an den Kanten versiegelt wurden.

Die Aufbewahrung erfolgte im Dunkeln bei 4°C und die Präparate wurden konfokalmikroskopisch analysiert.

2.2.5. Konfokal-Mikroskopie

Die Auswertung der fixierten und fluoreszenzmarkierten Präparate wurde an dem Konfokal-Mikroskop Leica LSCM SP2 mit der Software Leica-TCS 2.61 durchgeführt. Die Primärantikörper wurden je nach Spezies mit unterschiedlichen Sekundärantikörpern, die verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen haben, markiert. Für jeden Laser wurde der exakte Aufnahmebereich definiert, um eine Überstrahlung zu vermeiden:

Sekundärantikörper	Anregung	Emission	Aufnahmebereich
Alexa Fluor 488 (goat α -Mouse)	488nm	520nm	529nm-546nm
Cy3 (goat α -Rat)	543nm	568nm	560nm-610nm
Cy5 (goat α -Mouse)	633nm	670nm	649nm-705nm
DAPI	405nm	461nm	420nm-470nm
FITC (α -Rabbit)	488nm	520nm	529nm-546nm

Des Weiteren wurden die Präparate mit einer 63x-Vergrößerung im Mikroskop unter Verwendung des Objektivs 63x Lambda blue APO 1.4. angeschaut. Ebenfalls wurde ein 405nm Diodenlaser sowie ein Argon-Helium-Laser-Array zur Farbexcitation verwendet. Die digitalen Daten wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.37V (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) sowie dem Plug in RGB profiler weiter prozessiert.

2.2.6. Immunpräzipitationen

Je 25 μ l Sepharose-A- und Sepharose-G-Beads wurden gemischt und zweimal mit 1ml Lysepuffer gewaschen (1200rpm, 2min, 4°C). Anschließend wurden die Beads in einem Volumen von 500 μ l bestehend aus 250 μ l Überstandsantikörper (Konzentration ca. 5 μ g) und 250 μ l IP-Lyse-Puffer für 4h bei 4°C auf einem Orbitroller inkubiert. Von den kommerziellen Antikörpern wurde ebenfalls eine Konzentration von ca. 5 μ g eingesetzt. Für die Optimierung der IP-Effizienz des Primärantikörpers 6D7 (α Thr4-P) wurden die Sepharose-Beads mit einem Brücken-Antikörper (Affini-Pure Anti-Ratte, Dianova GmbH) für 1h bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Die Beads wurden zweimal mit 1ml Lysepuffer gewaschen und erst dann mit dem Primärantikörper für 4h bei 4°C inkubiert. Für die Anreicherung mitotischer Zellen wurden mindestens sechs große Zellkulturflaschen (650ml), die bis zu 70% konfluent bewachsen waren, mit Nocodazol (20ng/ml) für 8h synchronisiert.

Anschließend wurden durch Abklopfen die mitotischen von den adhären, nicht-synchronisierten Zellen getrennt und ausgezählt. Pro IP-Ansatz wurden 4×10^6 HeLa-Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in Lysepuffer aufgenommen (2×10^6 Zellen pro 100 μ l Lysepuffer). Die Lyse der Zellen erfolgte für 20min auf Eis unter sporadischem Vortexen. Anschließend wurden die Lysate auf Eis zweimal mit je 15 Stößen sonifiziert (Output 5, Duty Cycle 50%) und bei 4°C für 15min abzentrifugiert (14500rpm). Von diesen Lysaten wurde ein Volumen, das 200.000 Zellen entspricht, in 6xLämmli-Puffer aufgekoht (5min, 95°C) und als Input-Kontrolle verwendet. Die Antikörper-gekoppelten Sepharose-Beads wurden dreimal mit 1ml Lysepuffer gewaschen (4°C, 1200rpm, 1min) und dann mit dem restlichen Lysat in einem Gesamtvolumen von 500 μ l (+Lysepuffer) über Nacht bei 4°C auf einem Roller gemischt. Am nächsten Tag wurden die Beads abzentrifugiert (4°C, 1200rpm, 2min) und von diesem Überstand wiederum ein Volumen von 200.000 Zellen in 6xLämmli-Puffer lysiert (5min, 95°C). Die IP-Effizienz eines Antikörpers kann anhand dieser Überstands-Kontrolle ermittelt werden, da diese die Proteinzusammensetzung nach der IP im Gesamtzell-Extrakt widerspiegelt. Anschließend wurden die IPs fünfmal mit 1ml Lysepuffer gewaschen (4°C, 1200rpm, 2min) und die Beads in 30 μ l Lysepuffer sowie 30 μ l 2xLämmli-Puffer für 5min bei 95°C in einem Schüttler aufgekoht. Die eluierten Proteine wurden mittels Western-Analyse untersucht.

2.2.7. *In vitro* Analyse der rekombinanten Kinasen

Bei der Untersuchung der Säugetierkinasen wurde als Substrat das CTD-Peptid TS04 (4 Wiederholungen YSPTSPS) verwendet. Für die Quantifizierung mittels ELISA wurde dieses Peptid an 96-Loch Malamidplatten gekoppelt und für 60min bei 37°C in einem Carbonat-Puffer (pH 9,5) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Kinase-Experiment mit je 100ng der rekombinanten Kinasen (ProQinase GmbH, Freiburg) in 25 μ l Kinase-Puffer A bei 28°C für 60min durchgeführt. Anschließend wurde nochmals gewaschen und dann für 30min in PBS/Milch (1%) geblockt. Die Primärantikörper wurden für 30min zugegeben und nach einem weiteren Wasch- und Blockierungsschrift wurde mit Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpern für 30min inkubiert. Nach nochmaligen Waschen und Blockieren wurde Peroxidase-gekoppeltes Avidin zugegeben. Anschließend wurde fünfmal mit PBS gewaschen und 50 μ l des Substrat-Puffers, bestehend aus O-Phenyl-Diamin und

Wasserstoffperoxid, dazu gegeben. Der Farbumschlag der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 405nm im ELISA-Lesegerät gemessen.

Alternativ wurde als Substrat die endogene Pol-II eingesetzt. Hierzu wurde mit dem 1C7 Antikörper unphosphorylierte Pol-IIA aus Gesamtzell-Extrakten von HeLa-Zellen immunpräzipitiert. Das Kinase-Experiment wurde unter Verwendung von 200ng rekombinanter Kinase und 10µl des an Sepharose-Beads-gekoppelten Substrats in 40µl Kinase-Puffer B bei 30°C für 30min durchgeführt. Die Proben wurden mit 6xLämmli-Puffer 5min bei 95°C aufgeköcht und mittels Western-Analyse untersucht.

2.2.8. SiRNA-Transfektion

Für den Knockdown der Plk1- und Plk3-Kinase wurden am Vortag 80.000 HeLa-Zellen pro 6-Loch Zellkulturschale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen kurz vor der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 1ml OPTIMEM bei 37°C und 8% CO₂ inkubiert. Pro Transfektionsansatz wurden 3µl Oligofectamin mit 150µl OPTIMEM gemischt und parallel dazu wurde die jeweilige siRNA in einer Endkonzentration von 100nM mit 150µl OPTIMEM aufgenommen und für 3min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden beide Proben zusammenpipettiert und für 25min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Nach dieser Zeit wurden 600µl OPTIMEM zugegeben, das Medium von den Zellen entfernt und 900µl Transfektionsansatz für 6h auf die Zellen gegeben. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte ein Mediumswechsel zu DMEM und nach weiteren 24h wurden für den Plk1-Knockdown die Extrakte gemacht. Für den Plk3-Knockdown erfolgte nach 24h eine zweite Transfektion, identisch wie die erste und 68h nach der ersten Transfektion wurden die Proben genommen.

2.2.9. Oxidativer Stress

Am Vortag wurden 7×10^5 HeLa-Zellen in 10cm Zellkulturschalen ausplattiert und über Nacht in normalem DMEM-Medium kultiviert. Anschließend wurde das Medium ausgetauscht gegen eines mit 200µM H₂O₂ und die Zellen für 10min und 30min bei 37°C, 8% CO₂ inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden einmal kurz mit PBS gewaschen und dann mit 300µl 2xLämmli-Puffer lysiert (5min, 95°C).

2.2.10. Chromatin-Immunpräzipitation mit genomweiter Sequenzierung (ChIP-Seq-Analyse)

Präparation des Chromatins

Wildtyp- und stabil-transfizierte Raji-Zellen wurden bei Raumtemperatur für 10min durch Zugabe von der Crosslinking-Lösung (1/10 Volumen) in das Zellmedium gecrosslinkt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 250mM) für 5min gestoppt und die Zellen wurden mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen (1500rpm, 4°C, 4min). Anschließend wurden die Zellen ausgezählt, jeweils 5×10^7 Zellen aliquotiert und dann in je 2,5ml LP1 für 20min bei 4°C auf einem Drehrad lysiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1350g, 5min, 4°C) und das Chromatin-Pellet für 20min bei 4°C in 2,5ml LP2 gewaschen. Nach nochmaligen Abzentrifugieren (1350g, 5min, 4°C) wurde das Chromatin in 1,5ml LP3 resuspendiert und sonifiziert (14 Zyklen: 30sek an gefolgt von 30sek aus mit einer Amplitude von 40), wobei die Proben auf einer Eis-Lösung (500nM NaCl, 20% Ethanol) gekühlt wurden. Das Chromatin sollte durch Sonifizierung in eine gewünschte Fragmentgröße von 250 Basenpaaren gesichert werden. Nach Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 1%) wurde bei 4°C und 20.000g für 10min zentrifugiert und 50µl als Input-Kontrolle abgenommen. Die Extrakte wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der Input wurde 1:1 mit 2xElutions-Puffer gemischt und über Nacht bei 65°C für 13-15h inkubiert, um den Formaldehyd-Crosslink aufzuheben. Am nächsten Tag wurde TE-Puffer 1:1 zur Verdünnung des SDS des Elutions-Puffers zugegeben und für 2h bei 37°C mit RNaseA (Endkonzentration 0,2µg/ml) gefolgt von 2h bei 55°C mit Proteinase K (Endkonzentration 0,2µg/ml) verdaut. Die DNA wurde durch eine zweimalige Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) Extraktion und dem Qiaquick PCR Purification Kit gereinigt. Die DNA-Fragmentgrößen wurden in einem 2% Agarosegel überprüft (DNA-Menge 500ng pro Spur).

ChIP-Seq

Pro ChIP-Ansatz wurden 400µl Protein-G-Dynabeads dreimal mit 1ml Blocking-Lösung (0,5% BSA in PBS) gewaschen und anschließend 100µl Beads mit 10µg des jeweiligen Primärantikörpers über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Antikörper wurden die Proben am nächsten Tag

dreimal mit 1ml Blocking-Lösung gewaschen und dann in 100µl derselben resuspendiert. Die Antikörper-gekoppelten Beads wurden mit 1,5ml Zell-Extrakt (5×10^6 Zellen) gemischt und die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Dann wurden die Beads achtmal mit 1ml RIPA-Puffer und einmal mit 1ml TE, bestehend aus 50mM NaCl, gewaschen. Das immunpräzipitierte Chromatin wurde von den Beads in zwei Schritten bei 65°C für 15min und 10min in 110µl und 100µl Elutions-Puffer eluiert. Die beiden Eluate wurden vereinigt und der Crosslink über Nacht bei 65°C aufgehoben. Die Aufreinigung der DNA wurde identisch zum Input durchgeführt. 20% der ChIP-DNA wurde in hoch-sensitiven DNA-Chips des Bioanalyzer 2100 quantifiziert. Die weiteren Vorbereitungen und Analyse der Proben sowie die bioinformatische Auswertung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Andrau (Fred Koch und Nicolas Descostes, Marseille). Für die Analyse wurde das Standard-ChIP-Seq-Protokoll von Illumina (Illumina GA2x) angewandt (Koch et al., 2011; Hintermair et al., 2012).

3. Ergebnisse

In höheren Eukaryoten wird die Transkription der Gene von drei unterschiedlichen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen durchgeführt. Die RNA-Polymerase I transkribiert die rDNA der ribosomalen Gene, wohingegen die RNA-Polymerase III für die Synthese der Transfer-RNAs verantwortlich ist. Die RNA-Polymerase II (Pol-II) katalysiert die Transkription von proteinkodierenden Genen und kleinen nichtkodierenden RNAs. Alle drei Säugetier-RNA-Polymerasen sind Schlüsselenzyme der Genexpression, aber nur die Pol-II hat in der Evolution eine einzigartige Struktur, die carboxyterminale Domäne (CTD), für die große Untereinheit entwickelt. Die CTD der Säugetier-Pol-II besteht aus 52 Wiederholungen von Heptapeptiden mit dem Konsensus-Motiv Tyrosin-1-Serin-2-Prolin-3-Threonin-4-Serin-5-Prolin-6-Serin-7. Jede einzelne Aminosäure dieser Sequenz kann potenziell während des Transkriptionszyklus modifiziert werden, entweder durch Phosphorylierung der Tyrosin-, Threonin- oder Serin-Reste (Egloff und Murphy, 2008) oder durch Isomerisierung der Proline (*cis*- oder *trans*-Konformation) (Xu et al., 2003). Bisher wurde nur die Phosphorylierung der Serin-Reste an Position 2, 5 und 7 gut charakterisiert.

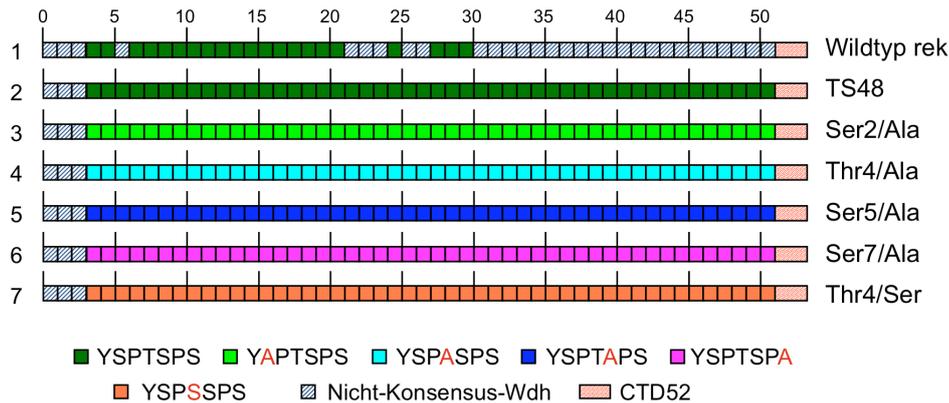
Die CTD wird für unterschiedliche Funktionen des Transkriptionszyklus wie die Transkriptions-Initiation, RNA-Elongation und Transkriptions-Termination gebraucht (Egloff und Murphy, 2008; Buratowski, 2009). Der Phosphorylierungsstatus der CTD koordiniert hierbei sowohl die Rekrutierung als auch die Ablösung von Transkriptions- und RNA-Prozessierungsfaktoren an den elongierenden Polymerase-Komplex. Dennoch ist bis heute unbekannt, ob die Phosphorylierung des Tyrosins und Threonins auch *in vivo* vorkommt und ob noch andere CTD-Modifikationen auftreten können. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung der Funktion und Phosphorylierung der Aminosäure Threonin-4 der CTD.

3.1 Einfluss bestimmter CTD-Aminosäurereste auf die Zellviabilität

Um die Rolle der Aminosäuren der CTD-Wiederholungseinheiten auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden RNA-Polymerasen mit mutierten CTD-Sequenzen (Chapman et al., 2005; Chapman, 2002) transient in HEK293-Zellen exprimiert.

Ergebnisse

A



B

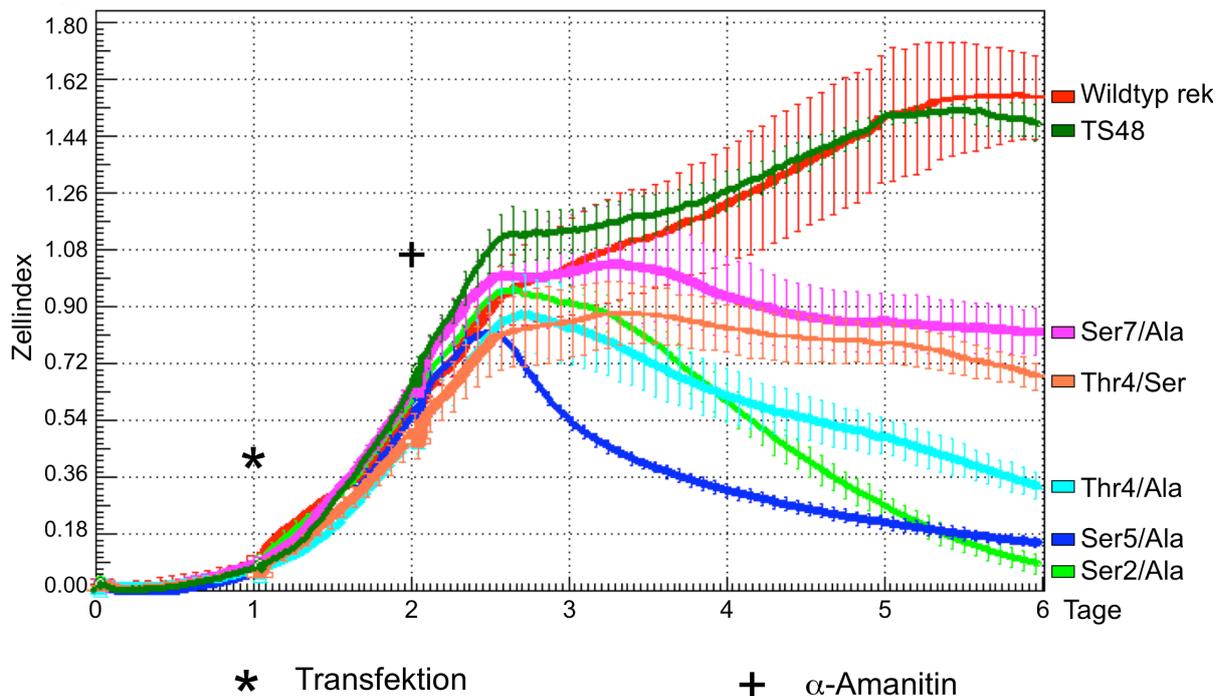


Abbildung 4: Einfluss der CTD-Aminosäuren auf die Zellproliferation. (A) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der verschiedenen synthetischen CTD-Konstrukte. Alle rekombinanten Polymerasen bestehen aus den Nicht-Konsensus-Wiederholungen 1 bis 3 und 52, die für die Stabilität des Enzyms essenziell sind. Die jeweils veränderte Aminosäure ist rot hervorgehoben und in allen 48 CTD-Wiederholungen ausgetauscht. (B) Proliferations-Assay von HEK293-Zellen während und nach der transienten Transfektion (*) der Expressions-Konstrukte und dem chemischen Knockdown der endogenen Pol-II durch die Zugabe von α -Amanitin (+).

Diese rekombinanten RNA-Polymerasen ermöglichen einen Vergleich von CTDs mit verschiedenen Zusammensetzungen der Aminosäuren der Heptapeptid-Sequenz *in vivo*. In Abbildung 4A ist eine schematische Darstellung der CTDs der verschiedenen rekombinanten RNA-Polymerasen zu sehen. Alle rekombinanten Polymerasen

bestehen aus den ersten drei und der letzten Wildtyp-Wiederholungseinheiten, da diese für die Stabilität des Enzyms essenziell sind (Chapman et al., 2005). Die erste Mutante stellt den rekombinanten Wildtyp (Wildtyp rek), bestehend aus Konsensus- und Nicht-Konsensus-Wiederholungen, dar und dient als Kontrolle. Die CTD der Mutante 2 (TS48) besitzt ausschließlich 48 Wiederholungen der Konsensussequenz, wohingegen die Mutanten 3 – 7 jeweils eine Aminosäure entweder zu Alanin oder zu Serin (Mutante 7) ausgetauscht haben. Diese rekombinanten Polymerasen haben eine zusätzliche Punktmutation (Asn793Asp), wodurch eine Resistenz gegen α -Amanitin, dem Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* erzeugt wird (Bartolomei und Corden, 1987). Die Zugabe von α -Amanitin führt zur Hemmung und einem raschen Abbau der endogenen Pol-II, wobei die Aktivität der rekombinanten Polymerase nicht beeinträchtigt wird (Meininghaus et al., 2000). Um die Auswirkung von Veränderungen in der CTD auf die Viabilität der Zellen zu analysieren, wurden die Mutanten transient transfiziert und die Zellproliferation mit dem Roche xCELLigence-System bestimmt. Das System ermöglicht die Analyse des biologischen Zellstatus, wie der Zellteilung oder der Veränderungen der Zellmorphologie in Echtzeit. Dazu wurden HEK293-Zellen in 96-Lochplatten ausplattiert, nach 24 Stunden mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert und nach weiteren 24 Stunden mit α -Amanitin behandelt (Abb. 4B, Transfektion (*); α -Amanitin (+)). Die Zellproliferation wurde über einen Zeitraum von sechs Tagen gemessen und anhand von Wachstumskurven in der Abbildung 4B dargestellt. Der rekombinante Wildtyp sowie die TS48-Mutante, deren CTD ausschließlich aus Konsensus-Wiederholungen besteht, zeigen einen ähnlichen Wachstumsverlauf mit stetiger Zunahme der Zellzahl. Im Gegensatz dazu erweisen sich die CTD-Mutanten Ser2/Ala und Ser5/Ala für die Zellen als letal. Auch die Thr4/Ala-Mutante führt zu einer starken Hemmung der Zellproliferation mit starker Abnahme der Zellzahl. Die Ser7/Ala- als auch die Thr4/Ser-Mutanten zeigen einen abgeschwächten Phänotyp und die Zellzahl nimmt nur langsam ab. Anhand dieses Experimentes konnte bestätigt werden, dass die CTD-Phosphorylierungsstellen Ser2 und Ser5 essenziell für die Zellen sind. In den Hefestämmen *S. cerevisiae* und *S. pombe* verursachen Thr4/Ala-Mutanten keinen Wachstumsdefekt (Schwer und Shuman, 2011). Da in unseren Experimenten die Aminosäure Thr4 weder durch ein Ser noch durch ein Ala ersetzt werden konnte, ohne gravierende Effekte auf die Zellen zu haben, scheint diese Position für die Säugetier-CTD essenziell zu sein. Dennoch ist bis heute unbekannt, ob das Threonin

in der Position 4 der CTD auch *in vivo* phosphoryliert wird und welchen Einfluss diese Aminosäure auf den Transkriptionszyklus haben könnte.

3.2 Charakterisierung der CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper

Ein geeignetes Werkzeug, um Aussagen über die einzelnen Phosphorylierungen der CTD-Wiederholungseinheiten *in vivo* treffen zu können, sind monoklonale Antikörper.

Phospho-peptide	Modifizierte Aminosäure	α Thr4-P 6D7	α Thr4-P 1G7	α Pol-II 1C7	α Ser2-P 3E10	α Ser5-P 3E8	α Ser7-P 4E12
CTD-1 YSPTSPSYSPTSPSC	-	-	-	+++	-	-	-
CTD-2 YSPT ^P SPSYSPTSPSC	T4	+++	+++	++	-	-	-
CTD-3 YSPT ^{PP} SPSYSPTSPSC	T4,S5	-	-	-	-	-	-
CTD-4 YSPTSP ^P SPSYSPTSPSC	S5	-	-	-	-	+++	-
CTD-5 YSPTSP ^P SPSYSPTSPSC	S7	-	-	+++	-	-	+++
CTD-6 YSPTSPSYSPTSP ^P SC	Y1	-	-	+++	-	-	-
CTD-7 YSPTSPSYSPTSP ^P SC	S2	-	-	+++	+++	-	-
CTD-8 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	S5,S2	-	-	-	++	+++	-
CTD-9 SPSYSPT ^P SPSYSPT ^P SC	S2,S5	-	-	-	-	-	-
CTD-10 YSPTSP ^{PP} SPSYSPTSPSC	Y1,S2	-	-	+++	-	-	-
CTD-11 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	S5,S7	-	-	-	-	+++	-
CTD-12 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	S7,S2	-	-	+++	+	-	+++
CTD-13 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	Y1,T4	+++	+++	+++	-	-	-
CTD-14 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	Y1,S5	-	-	+++	-	+++	-
CTD-15 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	T4,Y1	+++	+++	-	-	-	-
CTD-16 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	S5,Y1	-	-	-	-	+++	-
CTD-17 YSPTSP ^{PP} SPSYSPTSPSC	S7,Y1	-	-	+++	-	-	+++
CTD-18 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	S2,T4	+	-	+++	+++	-	-
CTD-19 YSPTSP ^P SPSYSPTSP ^P SC	T4,S7	+++	+++	-	-	-	-

Abbildung 5: Aminosäuresequenzen der CTD-Peptide. Zusammenfassung der Charakterisierung der generierten monoklonalen CTD-Antikörper. Die jeweils phosphorylierten Aminosäuren in den Di-Heptapeptiden sind rot (P) gekennzeichnet.

In unserem Labor wurden in den letzten Jahren CTD-Antikörper gegen jede einzelne potenzielle Phosphorylierungsstelle innerhalb des Heptapeptids (α Tyr1-P (Daten nicht gezeigt), α Ser2-P, α Ser5-P, α Ser7-P und α Thr4-P) hergestellt (Chapman et al.,

Ergebnisse

2007; Heidemann, 2010). Hierzu wurden verschiedene Di-Heptapeptide mit unterschiedlichen Modifikationsmustern synthetisiert (Abb. 5) und die generierten Hybridoma-Überstände auf ihre Spezifität gegenüber den verschiedenen CTD-Phosphorylierungspeptiden in ELISA-Experimenten getestet.

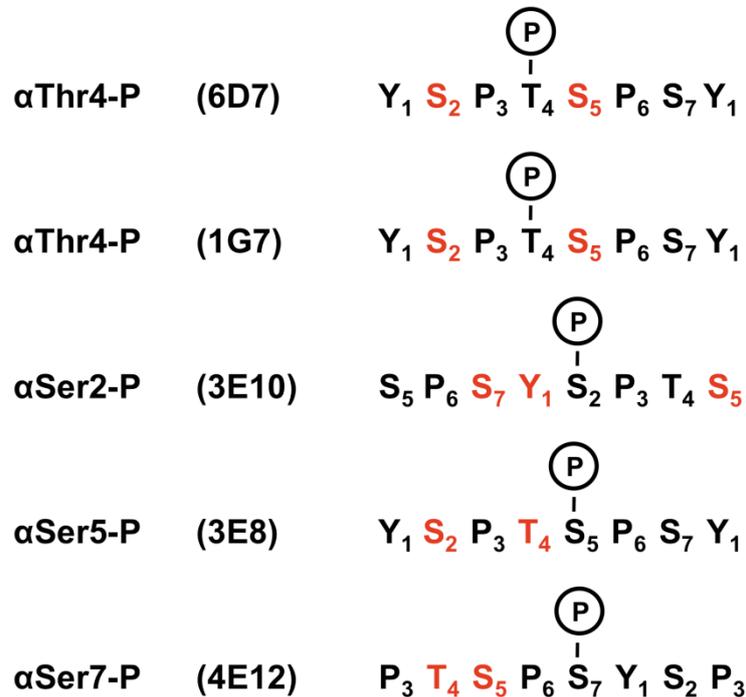


Abbildung 6: Überblick der Erkennungsmotive der monoklonalen Antikörper innerhalb eines Di-Heptapeptids. Modifikationen an Aminosäureresten in roter Schrift hemmen die jeweilige Antikörperbindung.

Die Verwendung von Di-Heptapeptiden beruht auf der Erkenntnis, dass die funktionelle Einheit der CTD nicht ein einzelnes Heptapeptid ist, sondern wahrscheinlich eine Sequenz, die innerhalb von einer Tandem-Wiederholung liegt (Stiller und Cook, 2004). Mittels synthetischer CTD-Peptide konnten auch Antikörper zweier unterschiedlicher Subklassen (Klon 6D7 = gamma-2b und 1G7 = gamma-2a) gegen Phosphothreonin-4 generiert werden. Eine Zusammenfassung der Charakterisierung der generierten monoklonalen CTD-Antikörper ist in Abbildung 5 zu sehen. Alle monoklonalen Antikörper zeigen eine sehr hohe Spezifität für die jeweilige Phosphorylierungsstelle. Es wurde aber auch deutlich, dass Di-Heptapeptide mit zusätzlichen phosphorylierten Aminosäuren zu einer Einschränkung der Erkennungsmotive der Antikörper führen können (Abb. 6). Die Phosphothreonin-4-Antikörper (Klon 6D7 und 1G7) werden zum Beispiel von einem vorausgehenden Phosphoserin-2 oder einem nachfolgenden Phosphoserin-5 inhibiert, aber nicht von

einem Phosphoserin-7 (Abb. 6). Der Phosphoserin-2-Antikörper (Klon 3E10) wird von einem nachfolgenden Phosphoserin-5 inhibiert jedoch nicht von einem Phosphoserin-5 im vorangehenden Heptapeptid. Zusätzlich wird der Phosphoserin-2-Antikörper von einem vorangehenden Phosphoserin-7, aber nicht von einem nachfolgenden Phosphothreonin-4 in seiner Erkennung behindert (Abb. 6). Diese Charakterisierung der monoklonalen CTD-Antikörper verdeutlicht die Komplexität und Sorgfalt, die bei der Interpretation der mit diesen Antikörpern generierten Ergebnisse später angewendet werden muss. Ein negatives Resultat der Antikörper muss nicht bedeuten, dass eine bestimmte Phosphorylierung in der CTD nicht vorkommt. Es wäre ebenfalls möglich, dass das Erkennungsmotiv für diese Phosphorylierung durch eine Modifikation der CTD in der Nachbarschaft behindert wird.

3.2.1. CTD-Threonin-4-Phosphorylierung in Gesamtzell-Extrakten

Als Nächstes wurden die bereits *in vitro* charakterisierten Phosphothreonin-4-Antikörper (Klon 6D7 und Klon 1G7) auf ihre Reaktivität und Funktionalität *in vivo* getestet. Hierzu wurden Gesamtzell-Extrakte von HeLa-Zellen mittels Western-Analyse auf eine mögliche Threonin-4-Phosphorylierung hin untersucht (Abb. 7A und B). Als Kontrolle wurde der Antikörper Pol3.3. (α Rpb1) verwendet, der ein konserviertes Epitop in der großen Untereinheit der Pol-II außerhalb der CTD erkennt. Dieser Antikörper zeigt Reaktivitäten sowohl gegen die hypophosphorylierte Pol-IIA-Form (schneller laufend in SDS-PAGE) als auch gegen die hyperphosphorylierte Pol-II0-Form (langsamer laufend in SDS-PAGE). Die Doppelmarkierung einer Nitrocellulose-Membran mit dem Phosphothreonin-4-spezifischen Antikörper 6D7 sowie dem Pol3.3.-Antikörper zeigt eindeutig, dass der Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 nur eine Reaktivität gegen die transkribierende Pol-II0-Form besitzt (Abb. 7A). Zusätzlich wurden Gesamtzell-Extrakte einer Auswahl an humanen Krebszelllinien und einer Mausfibroblastenlinie (NIH3T3) auf diese CTD-Modifikation hin analysiert. Es wurden Zellen einer Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa) und einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Raji) untersucht. Die Linie U2OS entspricht Osteosarkoma-Zellen und H1299-Zellen stammen von einer Lungenkarzinom-Zelllinie ab.

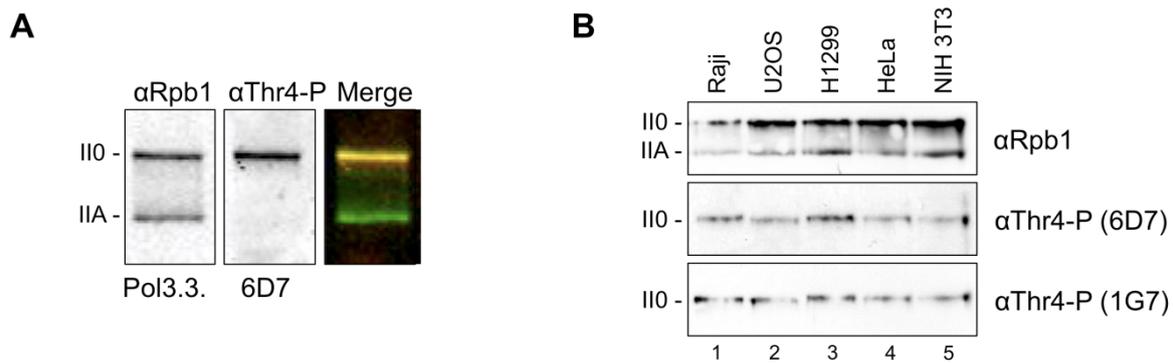


Abbildung 7: Reaktivität der Phosphothreonin-4-Antikörper in Säugetierzellen. (A) Gesamtzell-Extrakte von HeLa-Zellen wurden mittels Westernblot auf ihre CTD-Threonin-4-Phosphorylierung im Odysseyscan untersucht. Dargestellt ist links die Pol3.3.-Kontrolle im 800nm Kanal, in der Mitte der Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 im 680nm Kanal und rechts beide Wellenlängen übereinander gelagert (Merge, gelb/orange). **(B)** Western-Analyse der Reaktivitäten der Phosphothreonin-4-Antikörper (6D7 und 1G7) gegen Lysate von verschiedenen Säugetier-Zelllinien. Die Markierungen kennzeichnen die hypophosphorylierte Pol-IIA-Form (schneller laufend in SDS-PAGE) und die hyperphosphorylierte Pol-II0-Form (langsamer laufend in SDS-PAGE). Beide subklassenspezifischen Phosphothreonin-4-Antikörper zeigen nur Reaktivität gegen die transkribierende Pol-II0-Population.

Beide Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 (gamma-2b) und 1G7 (gamma-2a) bestätigen, dass diese CTD-Modifikation in allen untersuchten Gesamtzell-Extrakten vorkommt und ausschließlich die Pol-II0-Form anfärbt (Abb. 7B).

3.2.2. CTD-Phosphorylierungen in der Immunfluoreszenz

Die weitere Charakterisierung des Phosphothreonin-4-Antikörpers 6D7 erfolgte anhand von Immunfluoreszenzen. Diese Methode wurde angewandt, um die Fragestellung beantworten zu können, wie die verschiedenen CTD-Modifikationen in fixierten Zellen aussehen und ob Unterschiede in der Lokalisation der Pol-II abhängig von ihrer Phosphorylierung auftreten. Hierzu wurden fixierte, nicht-synchronisierte HeLa-Zellen mit je einem phosphorylierungsspezifischen Antikörper (α Ser2-P, α Ser5-P, α Ser7-P und α Thr4-P) sowie dem Pol3.3.-Antikörper inkubiert, die DNA mit DAPI gefärbt und anschließend unter dem Konfokal-Mikroskop betrachtet (Abb. 8A). Die Daten zeigen deutlich, dass alle vier phosphorylierungsspezifischen CTD-Antikörper sowie der Pol3.3.-Antikörper den Zellkern anfärben, wobei die Nukleoli ausgespart werden. Insbesondere der Phosphoserin-5- und der Phosphoserin-7-Antikörper weisen einzelne Stellen in der Zelle auf, an denen ihre Signale stark akkumulieren.

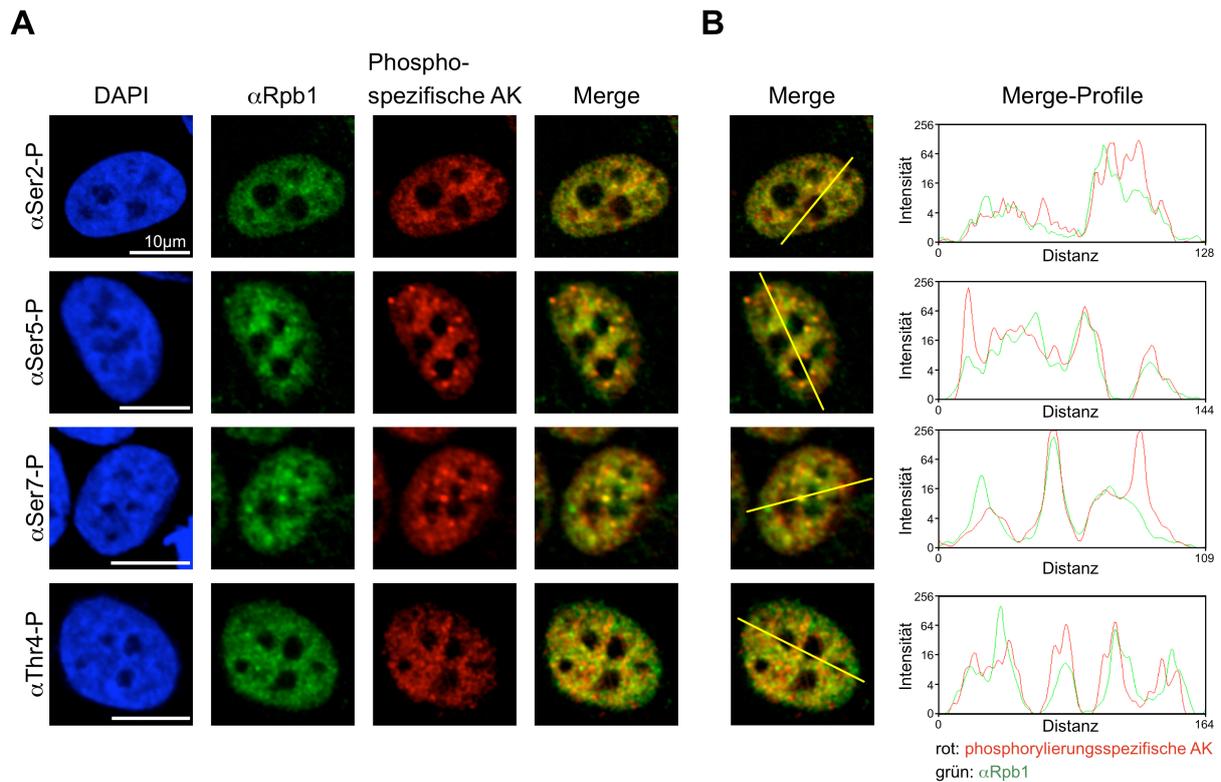


Abbildung 8: Immunfluoreszenz der CTD-Phosphorylierungen in Interphase-Zellen. (A) PFA-fixierte HeLa-Zellen wurden mit dem Pol3.3.-Antikörper (α Rpb1) und je einem der CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper inkubiert und im Konfokal-Mikroskop auf ihr Phosphorylierungsmuster in der Zelle untersucht. Der Sekundärantikörper gegen Pol3.3. ist Cy5 gekoppelt (grün-fluoreszierend) und der gegen die phosphorylierungsspezifischen CTD-Antikörper ist Cy3 markiert (rot-fluoreszierend). Links ist das mit DAPI angefärbte Chromatin zu sehen und ganz rechts sind die beiden Fluoreszenzen überlagert (Merge). Maßstab, 10 μ m. **(B)** Graphische Darstellung der Kolo-kalisationen der CTD-Modifikationen mit dem Pol3.3.-Antikörper. Die entsprechenden Fluoreszenzbilder wurden übereinandergelegt und mit dem Programm ImageJ (Plug in RGB profiler) bearbeitet. Die y-Achse entspricht den Werten der Fluoreszenz-Intensitäten, die in einer logarithmischen Skala von 2 wiedergegeben sind. Die erstellten Profile bestätigen eine stark heterogene Verteilung der Pol-II und ihrer Phosphorylierungen in den Zellkernen.

Die Phosphothreonin-4- und Phosphoserin-2-Antikörper zeigen dagegen eine eher gleichmäßige Verteilung ihrer Fluoreszenzen. Um Kolo-kalisationen der CTD-Modifikationen mit dem Pol3.3.-Antikörper nachweisen zu können, wurden jeweils die beiden entsprechenden Fluoreszenzbilder übereinandergelegt und mit dem Programm ImageJ (Plug in RGB profiler) analysiert (Abb. 8B). Die erstellten Profile zeigen eine stark heterogene Verteilung der Pol-II und ihrer Phosphorylierungen im Zellkern. Diese Daten ermöglichen eine Unterteilung der Pol-II in drei verschiedene Populationen. Bereiche mit hauptsächlich roter Fluoreszenz beinhalten Polymerasen mit sehr starken Phosphorylierungen der jeweiligen Aminosäure in der CTD, die das

grüne Signal des Pol3.3.-Antikörpers überstrahlen und wahrscheinlich Bereiche aktiver Gene darstellen. Einige Stellen erscheinen überwiegend grün-fluoreszierend und entsprechen wahrscheinlich unphosphorylierten Polymerasen. Gelb/Orange-fluoreszierende Areale stellen die dritte Population dar und beinhalten entweder Polymerasen mit gering phosphorylierter CTD oder ein Gleichgewicht von Polymerasen mit phosphorylierter und nicht-phosphorylierter CTD.

3.2.3. Ko-Immunpräzipitationen der CTD-Phosphorylierungen

Da jetzt monoklonale Antikörper für vier verschiedene CTD-Phosphorylierungen zur Verfügung standen, konnte die Frage untersucht werden, ob alle vier Modifikationen gleichzeitig in einer Polymerase vorkommen. Dazu musste zuerst geprüft werden, wie gut die einzelnen Antikörper präzipitieren, und anschließend, wie gut sie andere Modifikationen ko-präzipitieren. Hierzu wurde mit allen CTD-Antikörpern eine Immunpräzipitation (IP) aus Gesamtzell-Extrakten von HeLa-Zellen durchgeführt und diese mittels einer Western-Analyse auf die unterschiedlichen CTD-Modifikationen hin untersucht (Abb. 9). Zur Überprüfung der IP-Effizienz der Antikörper wurden Überstands-Kontrollen nach der IP mitgeführt. Alle Antikörper eignen sich für IP-Experimente und lassen positive Signale in der jeweils eigenen IP in der Immun-Detektion erkennen (Abb. 9A und B). Auch der Phosphothreonin-4-Antikörper zeigt für die eigene IP ein positives Signal in der Western-Analyse und immunpräzipitiert sich quantitativ, da keine Reaktivität in der Überstands-Kontrolle (ÜS) verbleibt (Abb. 9A, Spur 3). Die Daten bestätigen, dass der Phosphothreonin-4-Antikörper nur die transkribierende Pol-II₀-Form der großen Untereinheit Rpb1 immunpräzipitiert (Abb. 9A, α Rpb1, Spur 2).

Die Threonin-4-phosphorylierten Polymerasen scheinen einen Großteil an Serin-2-Phosphorylierung jedoch nur eine geringe Menge an Serin-5- und Serin-7-Phosphorylierung zu tragen (Abb. 9A). Da die Erkennung des Phosphothreonin-4-Antikörpers von einem vorausgehenden Phosphoserin-2 inhibiert wird (Abb. 6), können die Polymerasen folglich nicht an jeder Serin-2 Position der CTD phosphoryliert sein. Es scheinen ebenfalls fast alle Serin-2- und Serin-7-phosphorylierten Polymerasen eine Threonin-4-Phosphorylierung zu tragen (Abb. 9B, α Thr4-P). Serin-2-phosphorylierte Polymerasen zeigen in der Immun-Detektion positive Signale für alle getesteten CTD-Phosphorylierungen, aber nur die Threonin-4-Phosphorylierung wird quantitativ ko-präzipitiert (Abb. 9B, Spur 2 und 3). Gleiches

gilt für den Phosphoserin-5-Antikörper, wobei dieser Antikörper ausschließlich die Serin-7-Phosphorylierung quantitativ präzipitiert (Abb. 9B, Spur 4 und 5). Der Phosphoserin-7-Antikörper präzipitiert sowohl sich selbst als auch alle weiteren CTD-Phosphorylierungen quantitativ, da kaum Reaktivitäten in der Überstands-Kontrolle verbleiben (Abb. 9B, Spur 6 und 7).

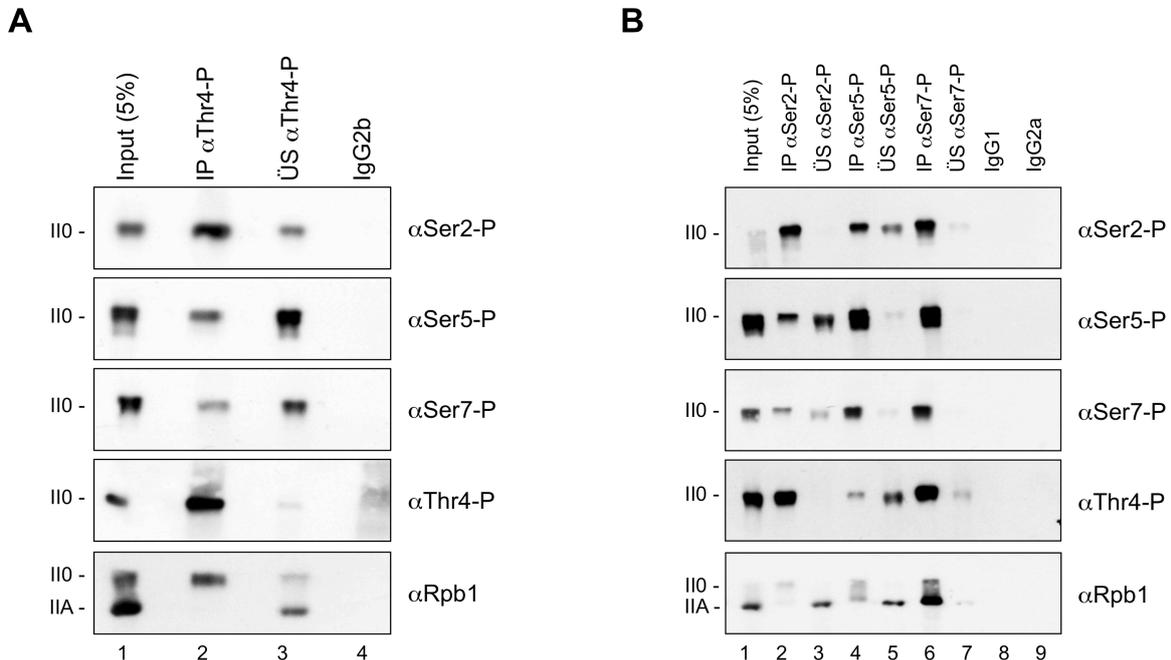


Abbildung 9: Ko-Immünpräzipitation der CTD-Phosphorylierungen. Untersuchung der Kombinatorik an CTD-Modifikationen mittels Western-Analyse nach Immunpräzipitation in HeLa-Zellen. Zur Überprüfung der IP-Effizienz der CTD-Antikörper wurde jeweils eine Überstands-Kontrolle (ÜS) mitgeführt. Die Markierungen kennzeichnen die beiden Polymerase-Formen (II0 und IIA). Ko-Immünpräzipitationen des Phosphothreonin-4-Antikörpers 6D7 (**A**) und der drei Serin-phosphorylierungsspezifischen Antikörper (**B**). Alle CTD-Antikörper eignen sich für IP-Experimente und immunpräzipitieren ihr Antigen quantitativ.

Diese Ergebnisse zeichnen ein Bild von sehr heterogen-CTD-modifizierten Polymerasen in den Zellen, da die CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper Pol-II mit allen getesteten Modifikationen präzipitieren können.

3.3 Identifizierung der Threonin-4-Kinase in Säugetierzellen

Threonin-4 konnte als weitere essenzielle Aminosäure der Säugetier-CTD für die Zellviabilität definiert und die Phosphorylierung dieser Position mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden. Daraus ergab sich die nächste Fragestellung, welche Kinase für diese CTD-Phosphorylierung verantwortlich ist.

3.3.1. Charakterisierung potenzieller CTD-Threonin-4-Kinasen *in vitro*

Um diese Frage zu beantworten, wurden 80 rekombinante Ser/Thr-CTD-Kinasen (Abb. Anhang A1, ProQinase) und die DNA-Pk-Kinase (Promega) *in vitro* auf ihre Fähigkeit getestet, CTD-Peptide an Threonin-4 zu phosphorylieren. Alle Kinasen wurden mit den nötigen Kofaktoren und einem CTD-Peptid, bestehend aus vier Konsensus-Wiederholungen, inkubiert und der Phosphorylierungsstatus des Peptids mit dem Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 in ELISA-Experimenten abgefragt (Daten nicht gezeigt). Dieser Assay ermöglichte eine Einschränkung der potenziellen Threonin-4-Kinasen auf 12 Kandidaten wie zum Beispiel Plk3- oder DNA-Pk-Kinase, die alle eine Phosphorylierungs-Aktivität über dem Hintergrund zeigten. Diese Kinasen wurden anschließend in einem weiteren von mir etablierten *in vitro* Kinase-Assay auf ihre spezifische Threonin-4-Phosphorylierungs-Aktivität hin analysiert.

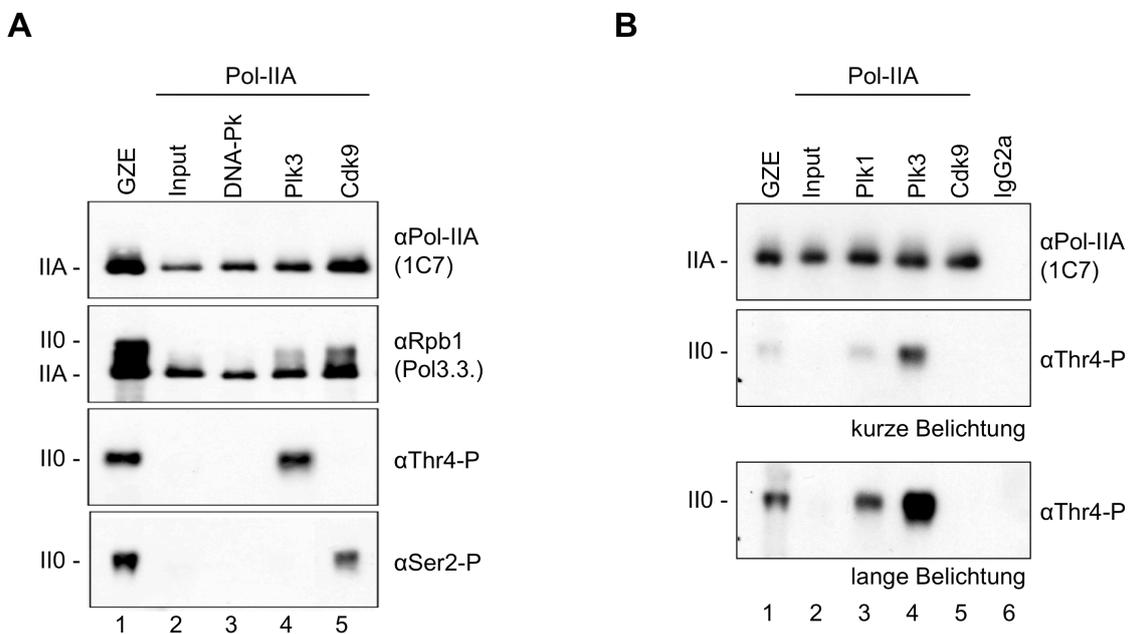


Abbildung 10: Die Kinasen Plk3 und Plk1 können die Säugetier-CTD an Threonin-4 *in vitro* phosphorylieren. Aus Gesamtzell-Extrakten (GZE) von HeLa-Zellen wurde mit dem 1C7 Antikörper unphosphorylierte Pol-IIA-Form immunpräzipitiert und als Substrat für die aufgereinigten Kinasen eingesetzt. Die Kinasen, in gleichen Konzentrationen, wurden mit ihren Kofaktoren und der Pol-IIA inkubiert und die Phosphorylierungs-Aktivität der Kinasen auf Serin-2 und Threonin-4 in einer Western-Analyse überprüft. Die Markierungen kennzeichnen die unphosphorylierte Pol-IIA-Form sowie die hyperphosphorylierte Pol-II0-Form. Die Kinasen Plk3, Cdk9 (**A**) und Plk1 (**B**) können die Pol-IIA spezifisch phosphorylieren, wodurch ein Shift von der Pol-IIA- zur Pol-II0-Bande erfolgt.

Hierzu wurde mit dem monoklonalen CTD-Antikörper 1C7 die unphosphorylierte Pol-IIA-Form aus Gesamtzell-Extrakten von HeLa-Zellen immunpräzipitiert und als Substrat für die Kinasen verwendet. Da sowohl die Erkennungssequenzen der Kinasen in der CTD als auch die Notwendigkeit etwaiger Kofaktoren nicht bekannt sind, ist die Verwendung der endogenen Pol-IIA als natürliches Substrat von Vorteil. Sie enthält alle 52 Heptapeptid-Einheiten und somit alle Konsensus- und Nicht-Konsensus-Wiederholungen. Die Kinasen DNA-Pk, Plk3 und Cdk9 wurden mit ihren Kofaktoren und der präzipitierten Pol-IIA inkubiert und die Phosphorylierungs-Aktivität mithilfe des Phosphoserin-2- sowie des Phosphothreonin-4-Antikörpers in Western-Analysen ermittelt (Abb. 10A). Im Gesamtzell-Extrakt (GZE) erkennt der 1C7-Antikörper nur die Pol-IIA-Form, der Pol3.3.-Antikörper dagegen die Pol-IIA- und die Pol-II0-Form und es sind spezifische Phosphothreonin-4- und Phosphoserin-2-Signale vorhanden (Abb. 10A, Spur 1). Der Input repräsentiert die präzipitierte Pol-IIA. Der Pol3.3.-Antikörper erkennt im Input nur noch die Pol-IIA-Form, die keine CTD-Phosphorylierung zeigt (Abb. 10A, Spur 2). Die Inkubation des unphosphorylierten Pol-IIA-Substrats mit der DNA-Pk-Kinase hat keinen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus der CTD (Abb. 10A, Spur 3), wohingegen die Inkubation mit der Plk3-Kinase zu einer Threonin-4-spezifischen-Phosphorylierung der Pol-IIA führt (Abb. 10A, Spur 4). Diese Phosphorylierung bewirkt einen Shift in die Pol-II0-Form, der auch mit dem Pol3.3.-Antikörper an dem leichten Schmier von der Pol-IIA- zur Pol-II0-Bande erkennbar ist. Die Kinase Plk1 zeigt eine um das ca. 10-fache verringerte Threonin-4-spezifische Phosphorylierungs-Aktivität (Abb. 10B). Als Positivkontrolle dient Cdk9, die bekannte Serin-2 CTD-Kinase, die ausschließlich zu einer Serin-2-spezifischen Phosphorylierung des Substrat führt und ebenfalls einen Shift in die Pol-II0-Form zur Folge hat (Abb. 10A, Spur 5). Von allen getesteten Kinasen zeigen Plk3 und Plk1 die deutlichsten Aktivitäten für eine Threonin-4-Phosphorylierung der CTD *in vitro* (Daten nicht gezeigt). Beide Kinasen sind potenzielle Ser/Thr-Kinasen die zur Familie der Polo-ähnlichen Kinasen (*Polo-like kinase*) gehören und essenzielle Rollen während des Zellzyklus erfüllen. Plk1 spielt eine zentrale Rolle während der Mitose und reguliert durch Phosphorylierung von Proteinen die verschiedenen Phasen der Mitose (Kishi et al., 2009). Da für die Pol-II ebenfalls eine mitosespezifische Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Hintermair, 2007), scheint Plk1 ein aussichtsreicher Kandidat für diese Zellzyklus-spezifische CTD-Modifikation zu sein. Im Abschnitt 3.6. der vorliegenden Arbeit wird

dieser Aspekt weitergehend untersucht. Die Plk3-Kinase scheint während des Zellzyklus ziemlich konstant exprimiert zu sein und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Signalwegen, ausgelöst durch verschiedene Stresse wie zum Beispiel Schäden an der DNA (Lowery et al., 2005). Des Weiteren wird Plk3 für den Eintritt in die S-Phase benötigt (Zimmermann und Erikson, 2007) und fungiert auch als Tumorsuppressor (Yang et al., 2008).

3.3.2. Plk3 phosphoryliert Threonin-4 *in vivo*

Um zu testen, ob die Aminosäure Threonin-4 der CTD der Pol-II auch *in vivo* von der Plk3-Kinase phosphoryliert werden kann, wurden Knockdown-Experimente in HeLa-Zellen durchgeführt. Die Expression von Plk3 wurde durch RNA-Interferenz für 68 Stunden gehemmt und die daraus resultierenden Effekte auf die Mengen verschiedener Proteine mittels Western-Analyse untersucht (Abb. 11).

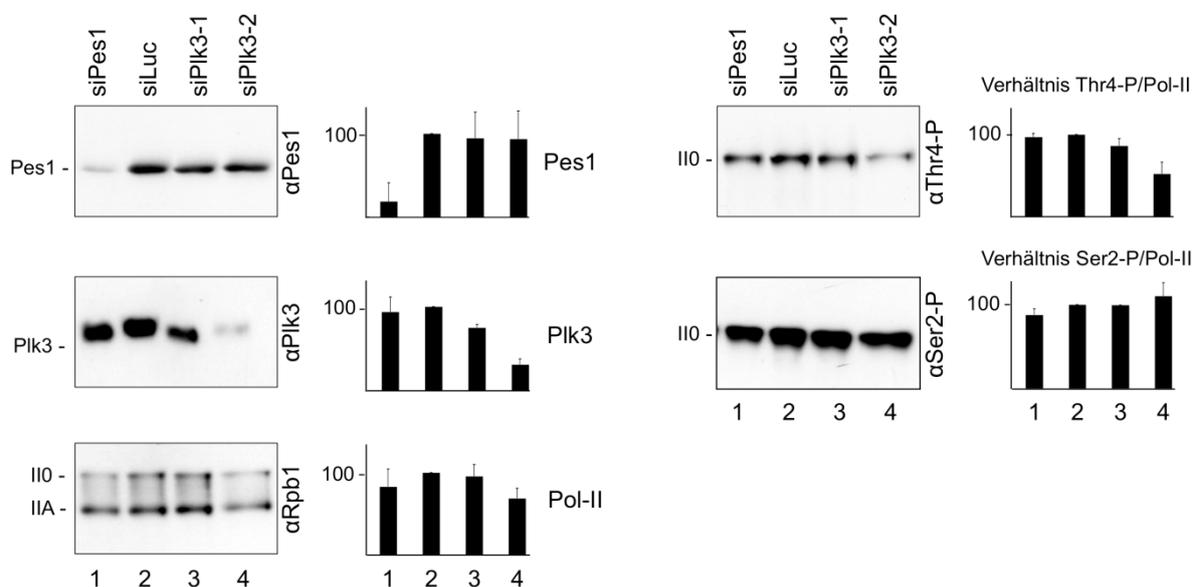


Abbildung 11: Plk3 phosphoryliert die CTD-Aminosäure Threonin-4 *in vivo*. Western-Analyse nach siRNA-Knockdown von Plk3 in HeLa-Zellen. Die Expression der Plk3-Kinase wurde mit zwei siRNAs (100nM) für 68 Stunden gehemmt. Die Signal-Intensitäten aller Antikörper wurden quantifiziert (AIDA) und sind graphisch dargestellt. Es erfolgte eine Normierung der Phosphoserin-2- und der Phosphothreonin-4-Antikörper-Intensitäten gegen die des Pol3.3.-Antikörpers. Anschließend wurden die quantifizierten Werte aller Proteine auf die Luciferase siRNA normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Versuchsdurchführungen mit deren Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die y-Achse entspricht den normierten Signal-Intensitäten (in Prozent) des jeweiligen Proteins. Die Reduktion des Plk3-Proteinlevels (siPlk3-2) auf ca. 40% der Kontrollzellen führt ebenfalls zu einer starken Abnahme des Threonin-4-Phosphorylierungslevels auf 50%.

Der Knockdown von Pes1 (*Pescadillo 1*, Prozessierungsfaktor) um ca. 80% hat keine Auswirkungen auf Plk3-Proteinlevel und Kinaseaktivität (Abb. 11, Spur 1). Der siRNA-Knockdown von Plk3 reduziert den Plk3-Proteinlevel auf weniger als 40% im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dies hat geringe Effekte auf die Menge der Pol-II, führt aber zu einer starken Abnahme des Threonin-4-Phosphorylierungslevels (50%). Die Menge an Serin-2-Phosphorylierung bleibt dagegen nahezu unverändert (Abb. 11, Spur 4). Ein möglicher Grund für die nicht komplette Verringerung des Threonin-4-Phosphorylierungslevels könnte der unvollständige Plk3-Knockdown oder die Aktivität einer weiteren Threonin-4-spezifischen Kinase sein.

3.3.3. Auswirkung von oxidativem Stress auf die Kinase Plk3

Ein zweiter Ansatz, Plk3 *in vivo* als eine Threonin-4-spezifische CTD-Kinase zu prüfen, ergab sich aus der Beobachtung, dass die Kinase durch oxidativen Stress aktiviert wird (Xie et al., 2001; Yang et al., 2008; Wang et al., 2008).

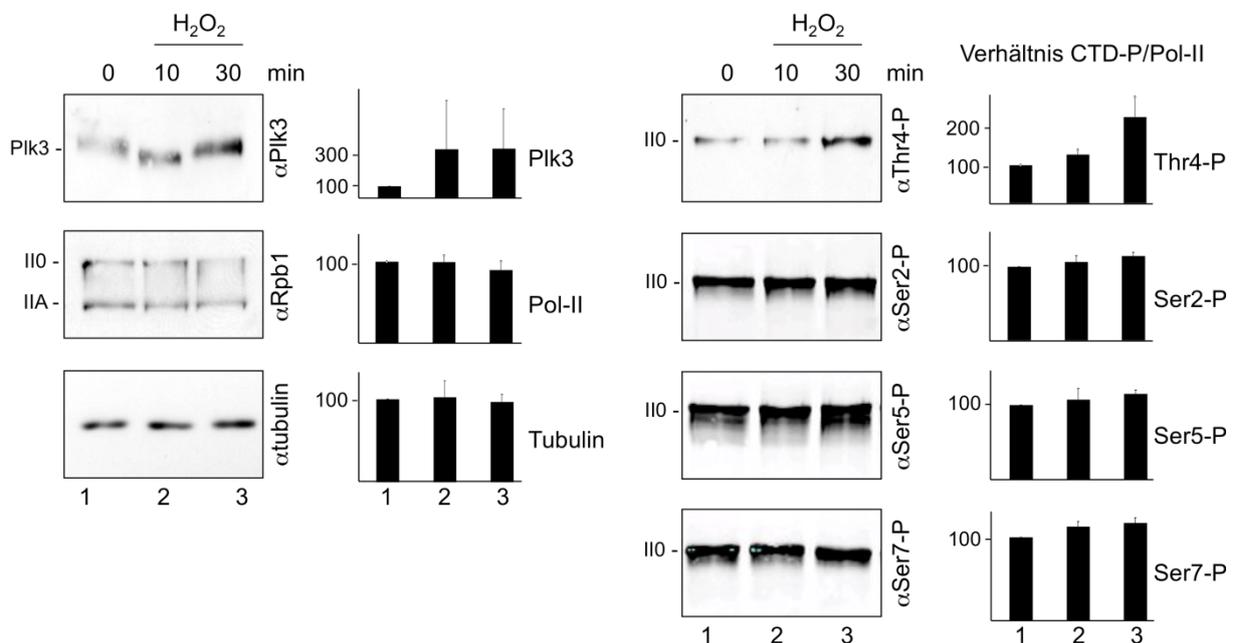


Abbildung 12: Western-Analyse des Plk3-Proteinlevels und der CTD-Modifikationen nach oxidativem Stress. Inkubation von HeLa-Zellen mit Wasserstoffperoxid (200µM) für 30min führt zu einer Aktivierung der Plk3-Kinase sowie zu einer signifikanten Zunahme des Threonin-4-Phosphorylierungslevels. Die Intensitäten wurden quantifiziert (AIDA) und graphisch dargestellt. Es erfolgte eine Normierung der phosphorylierungsspezifischen Signale gegen die Signale des Pol3.3.-Antikörpers. Anschließend wurden die quantifizierten Werte von allen Proteinen auf die der unbehandelten Zellen (100%) normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit ihren Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die y-Achse entspricht den normierten Signal-Intensitäten (in Prozent) des jeweiligen Proteins und die x-Achse gibt die verschiedenen Zeitpunkte der Kinetik wieder.

Zur Bestätigung dieser Aussage und zur Untersuchung der CTD-Phosphorylierungen unter diesen Bedingungen wurden HeLa-Zellen mit 200µM Wasserstoffperoxid für 10 und 30 Minuten inkubiert und Gesamtzell-Extrakte hergestellt. Der Plk3-Proteinlevel und der CTD-Phosphorylierungsstatus wurden in einer Western-Analyse untersucht (Abb. 12). Veränderungen in der Menge der Pol-II über den Zeitraum dieser Stresskinetik konnten nicht festgestellt werden. Die Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid für 30min führt aber zu einer Zunahme der Plk3-Proteinmenge und parallel erhöht sich der Threonin-4-Phosphorylierungsstatus der CTD. Serin-2-, Serin-5- und Serin-7-Phosphorylierungslevel erhöhen sich dagegen nicht (Abb. 12, Spur 3). Anhand von RNAi- und oxidativen Stress-Experimenten konnte ein Zusammenhang zwischen der Plk3-Kinaseaktivität und einer spezifischen Threonin-4-Phosphorylierung der Säugetier-CTD *in vivo* hergestellt werden. Plk3 konnte als eine Threonin-4-spezifische CTD-Kinase identifiziert werden und scheint Threonin-4 stressabhängig zu phosphorylieren.

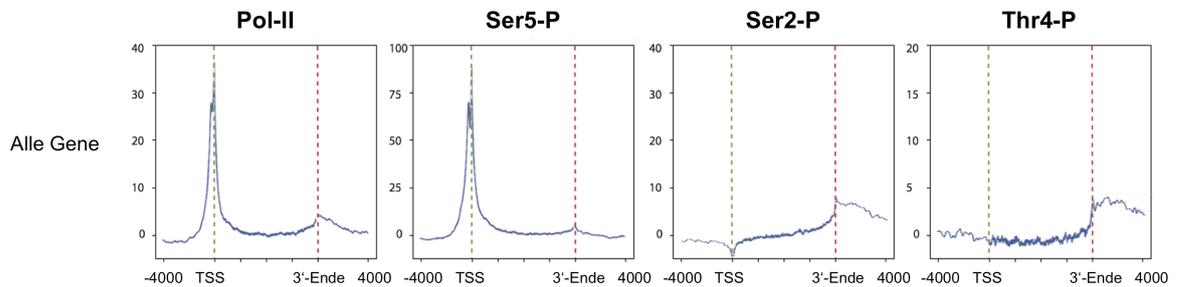
3.4 Genomweite Profile der CTD-Phosphorylierungen in Säugetieren

Da in den vorangegangenen Experimenten Threonin-4 als weitere CTD-Phosphorylierung charakterisiert und Plk3 als eine Threonin-4-spezifische CTD-Kinase identifiziert werden konnte, war der nächste Schritt herauszufinden, wie die Verteilung von Pol-II mit einer Threonin-4-Phosphorylierung der CTD genomweit aussieht. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Andrau (Marseille) Profile für die genomweite Verteilung der CTD-Modifikationen in Raji-Zellen erstellt (Abb. 13). Während eines vierwöchigen Aufenthalts in dessen Arbeitsgruppe wurde die Methode der Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) mit anschließender DNA-Sequenzierung (Deep-Sequencing) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde das Standardprotokoll von Illumina verwendet und die bioinformatische Auswertung wurde von der Arbeitsgruppe von J.-C. Andrau durchgeführt. Das Profil für die genomweite Verteilung der gesamten Pol-II ergibt eine Akkumulation der Polymerase an der Transkriptionsstartstelle (TSS) und der RNA-Prozessierungsstelle am 3'-Ende der Gene. Das Serin-5-Phosphorylierungs-Profil zeigt eine sehr starke Anreicherung dieser CTD-Modifikation ausschließlich an der TSS, wohingegen die Serin-2-Phosphorylierung erst innerhalb der Gene stetig zunimmt und die stärksten Signale an den 3'-Enden der Gene generiert (Abb. 13). Die Signale für die Threonin-4-

Ergebnisse

Phosphorylierung sind zwar gering, aber dennoch eindeutig, und ergeben eine schwache Anreicherung innerhalb der Gene, gefolgt von einer starken Zunahme im Bereich der 3'-Region der Gene. Die repräsentative genomweite Verteilung der Serin-2- und der Threonin-4-Phosphorylierung nach der Zusammenfassung aller Gene erscheint auf den ersten Blick relativ ähnlich (Abb. 13A).

A



B

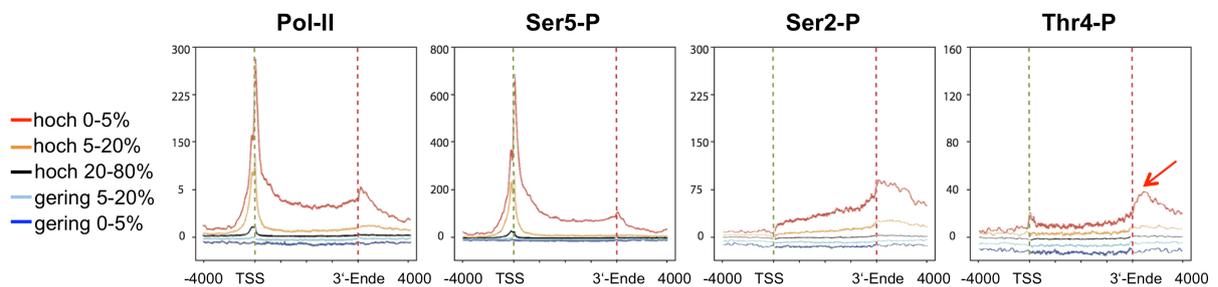


Abbildung 13: Threonin-4-phosphorylierte Pol-II ist in den 3'-Regionen von Genen angereichert. ChIP-Seq-Bindungsprofile für die gesamte (Pol-II), die initiiierende (Ser5-P), die elongierende (Ser2-P) und die Threonin-4-phosphorylierte Pol-II in Raji-Zellen. Die unterbrochenen Linien markieren die Transkriptionsstartstelle (TSS, grün) sowie die RNA-Prozessierungsstelle am 3'-Ende der Gene (rot). Die y-Achse entspricht den normalisierten ChIP-Seq-Signalen und die x-Achse dem Abstand zur TSS (bp). **(A)** Repräsentative, genomweite Verteilung der Pol-II und der verschiedenen CTD-Phosphorylierungen nach Zusammenfassung aller Gene. **(B)** Farbliche Unterteilung der Gene in verschiedene Gruppen, abhängig von den Signal-Intensitäten.

Vergleicht man aber die Gene mit den stärksten Pol-II-Signalen (hoch, 0-5%), dann ergeben sich für die Profile von Serin-2 und Threonin-4 deutliche Unterschiede. Die Signale für die Threonin-4-Phosphorylierung zeigen eine starke Anreicherung erst nach dem 3'-Ende der Gene (Abb. 13B, Pfeil). Die Untersuchung einzelner Gene konnte die Unterschiede im Auftreten der Serin-2- und der Threonin-4-Phosphorylierung im 3'-Bereich der Gene weiter verdeutlichen. Die Serin-2-Phosphorylierungssignale nehmen deutlich zum 3'-Ende der Gene zu, wohingegen die

Threonin-4-Phosphorylierung erst einige hundert Nukleotide später akkumuliert (Abb. 14 und Anhang A2). Die genomweite Untersuchung der Pol-II-Modifikationen in Säugetierzellen zeigt somit, dass diese in unterschiedlichen Gen-Bereichen verschieden stark auftreten. Die für die Transkriptions-Initiation essenzielle Serin-5-Phosphorylierung tritt vor allem an der TSS der Gene auf.

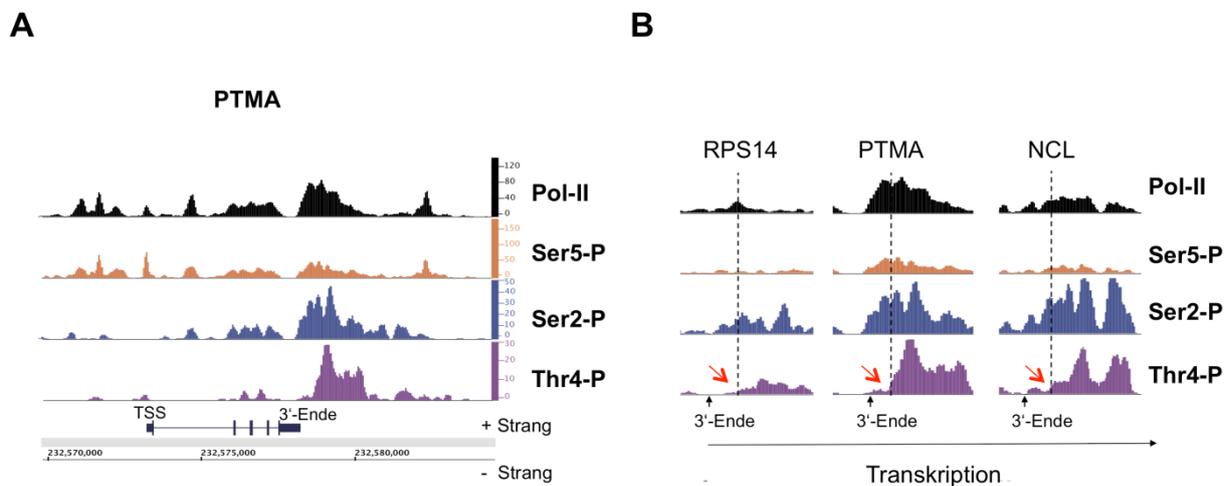


Abbildung 14: Genomweite Pol-II- und CTD-Phosphorylierungsprofile für einzelne Gene. (A) PTMA (*Prothymosin alpha*) ist ein repräsentatives Beispiel für Gene mit hohen Threonin-4-Phosphorylierungssignalen in den 3'-Regionen. Die normalisierten ChIP-Seq-Signale sind für jeden Antikörper an der y-Achse erkennbar. Unterhalb der ChIP-Seq-Profile ist die Lage des Gens auf dem positiven (+) oder negativen (-) Strang sowie die Transkriptionsstartstelle (TSS) als auch die RNA-Prozessierungsstelle (3'-Ende) angezeichnet. (B) RPS14 (*Ribosomal protein S14*), PTMA und NCL (*Nucleolin*) sind repräsentative Gene zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Serin-2- und Threonin-4-Phosphorylierungsprofile in den 3'-Bereichen. Dargestellt sind nur die 3'-Regionen der Gene und die unterbrochenen Linien markieren die Zunahme der Threonin-4-Phosphorylierungssignale (roter Pfeil).

Die für die Elongation wichtige Serin-2-Phosphorylierung passiert erst innerhalb der Gene und akkumuliert am 3'-Ende. Die Profile der neuen Threonin-4-Phosphorylierung zeigen eine starke Anreicherung im 3'-Bereich der Gene und lassen auf eine mögliche Funktion dieser CTD-Modifikation in der 3'-Prozessierung oder der Termination der Transkription schließen. Dennoch ist bei der Interpretation dieser Profile immer darauf zu achten, dass die Abwesenheit einer Modifikation mindestens zwei Ursachen haben könnte: das tatsächliche Fehlen dieser Modifikation oder die Hemmung der Antikörperbindung durch eine benachbarte andere Modifikation der CTD.

3.5 Auswirkung der Thr4/Ala-Mutante auf die genomweite Verteilung der Pol-II

Um die Rolle der Threonin-4-Phosphorylierung *in vivo* zu untersuchen, wurde die genomweite Verteilung der Pol-II in Thr4/Ala-Mutanten analysiert. Hierzu wurden Raji-Zelllinien verwendet, in denen sich rekombinante Polymerase-Konstrukte konditional exprimieren lassen (Meininghaus et al., 2000). Da die Thr4/Ala-Mutante bereits in unserem Proliferationsassay eine hohe Sterblichkeit der Zellen verursachte, wurde auf dieses Zellsystem zurückgegriffen, um ausreichendes Material für die ChIP-Sequenzierungs-Analysen (ChIP-Seq-Analyse) zu gewährleisten. 24 Stunden nach Induktion des rekombinanten Wildtyps (WT rek), der TS48- (TS48) sowie der Thr4/Ala-Mutante wurde α -Amanitin in das Zellmedium gegeben und nach weiteren 48 Stunden Gesamtzell-Extrakte hergestellt.

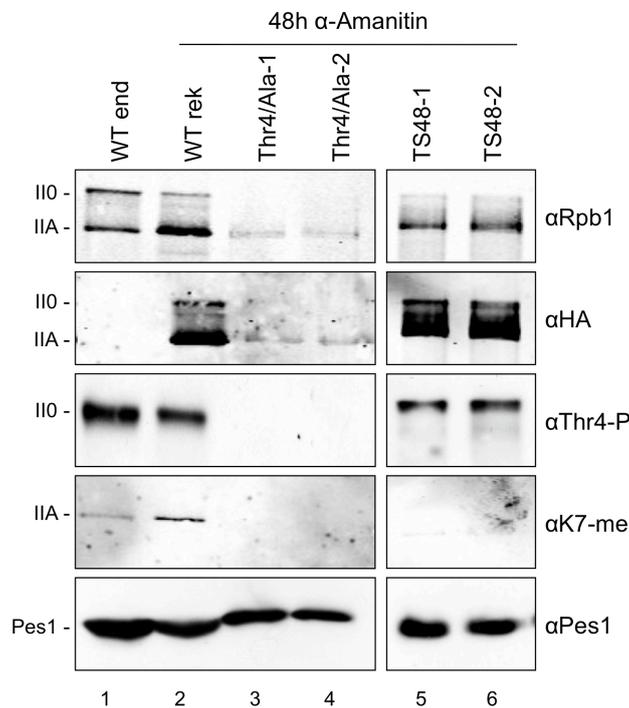
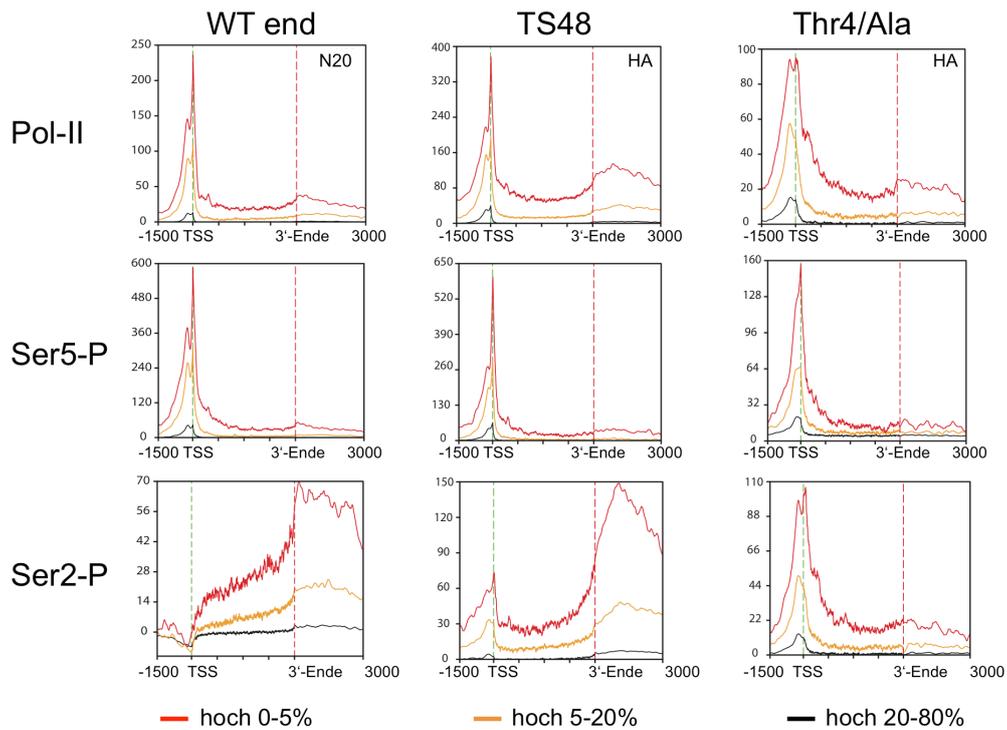


Abbildung 15: Überprüfung der Induktion der rekombinanten Polymerasen. Western-Analyse von Raji-Gesamtzell-Extrakten 24 Stunden nach Induktion der rekombinanten Polymerasen und 48 Stunden nach Zugabe von α -Amanitin. Um die Expression der exogen-exprimierten, α -Amanitin-resistenten CTD-Mutanten zu zeigen, wurden die Membranen sowohl mit dem Pol3.3.-Antikörper als auch mit einem Antikörper gegen die HA-Markierung (3F10) inkubiert. Die spezifische Inhibierung der endogenen Pol-II kann durch den Verlust der Phosphothreonin-4- und der Lysin-7-methylierungsspezifischen-Antikörper-Reaktivität nachgewiesen werden. Alle rekombinanten Polymerasen können induziert werden.

Die Induktion der rekombinanten Polymerasen und die spezifische Inhibierung der endogenen Pol-II durch α -Amanitin wurden in einer Western-Analyse überprüft (Abb. 15). Als Kontrolle für die Induktion dient ein Gesamtzell-Extrakt von Raji-Zellen. Vergleicht man die Signale des Pol3.3.-Antikörpers, der die große Untereinheit der exogenen und endogenen Pol-II erkennt, mit denen des HA-Antikörpers, der gegen die Hämagglutinin-Markierung der exogenen Polymerasen reaktiv ist, dann lässt sich erkennen, dass die rekombinanten Polymerasen induziert sind. Der rekombinante Wildtyp und die TS48-Mutanten zeigen eine ca. 5-fache Überexpression, die beiden Thr4/Ala-Zelllinien eine ca. 2-fache Unterexpression im Vergleich zum endogenen Wildtyp. Die Reaktivitäten des Phosphothreonin-4-spezifischen Antikörpers 6D7 sowie des Lysin-7-methylierungsspezifischen Antikörpers (α K7-me, Klon 1F5) sind in den Thr4/Ala-Zelllinien komplett verschwunden. Die Lysin-7-Methylierung der CTD ist eine Modifikation, die nur in den Nicht-Konsensus-Wiederholungen vorkommt. Da sowohl die TS48- als auch die Thr4/Ala-Mutanten aus 48 Konsensus-Wiederholungen bestehen, dient der K7-me-Antikörper als weitere Kontrolle für den vollständigen Knockdown der endogenen Pol-II. Anschließend wurde mit Raji-Zellen und den beiden rekombinanten Zelllinien TS48 und Thr4/Ala eine ChIP-Seq-Analyse durchgeführt (Abb. 16). Die Profile für die TS48-Mutante und den endogenen Wildtyp weisen eine ähnliche genomweite Verteilung der Pol-II auf. Beide Polymerasen zeigen eine starke Anreicherung an der TSS und im 3'-Bereich der Gene, wobei die Akkumulation der TS48-Mutante am 3'-Ende im Vergleich zum endogenen Wildtyp etwas höher ist (Abb. 16A und B). Der Einfluss auf die genomweite Verteilung der Pol-II mit einer CTD, die ausschließlich aus Konsensus-Wiederholungen besteht, ist folglich sehr gering. Der Vergleich der TS48- und Thr4/Ala-Profile zeigt, dass die Expression der Thr4/Ala-Mutante zwar verringert ist, trotzdem ist die Thr4/Ala-Polymerase kurz nach ihrer Induktion auf Chromatin nachweisbar. In den Profilen der Thr4/Ala-Mutante ist zusätzlich zu der Anreicherung der Polymerasen an der TSS eine weitere Anreicherung einige hundert Nukleotide unterhalb der TSS erkennbar (Abb. 16B, Thr4/Ala). Dieser weitere Pol-II-Peak scheint mit erhöhten Serin-2- und Serin-5-Phosphorylierungssignalen assoziiert zu sein (Abb. 17) und stellt wahrscheinlich blockierte Pol-II dar. Die Expression der Thr4/Ala-Mutante führt ebenfalls zur Entfernung der Serin-2-Phosphorylierungssignale am 3'-Ende der Gene.

A



B

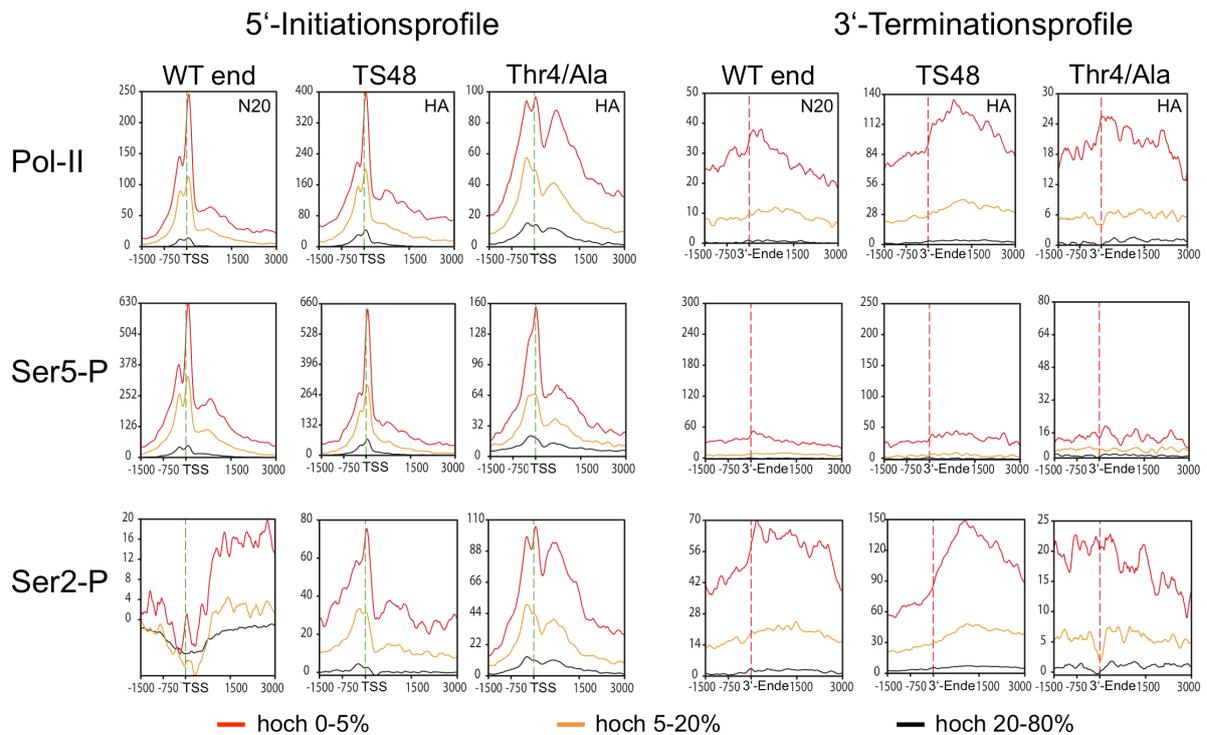


Abbildung 16: Genomweite Pol-II-Verteilung in der Thr4/Ala-Mutante. ChIP-Seq-Bindungsprofile für die gesamte (Pol-II), die initierende (Ser5-P) und die elongierende (Ser2-P) Pol-II in Raji-Zellen, der TS48- und der Thr4/Ala-Mutante. Die rekombinanten Polymerasen wurden vor dem Crosslink für 24 Stunden induziert und anschließend für 48 Stunden mit α -Amanitin behandelt. Die unterbrochenen Linien markieren die Transkriptionsstartstelle (TSS, grün) sowie die RNA-Prozessierungsstelle am 3'-Ende der Gene (rot). Die y-Achse entspricht den normalisierten ChIP-Seq-Signalen und die x-Achse

Ergebnisse

dem Abstand zur TSS (bp). **(A)** Repräsentative, genomweite Verteilung der Pol-II sowie der Serin5- und Serin2-Phosphorylierung aller Gene. **(B)** Detaillierte Darstellung der Initiations- und Terminationsbereiche der Gene. Farbliche Unterteilung der Gene in verschiedene Gruppen, abhängig von den Signal-Intensitäten. Die letale Thr4/Ala-Mutante ist kurz nach der Induktion an Chromatin gebunden und scheint die Transkription noch zu initiieren, aber nicht mehr RNA elongieren zu können.

Da sowohl die TS48- als auch die Thr4/Ala-Mutante diese Phosphoserin-2-Anreicherung an der TSS aufweisen, könnte die Überexpression der exogenen Pol-II ein möglicher Grund für diese artifizielle Serin-2-Phosphorylierung sein. Allerdings zeigen die Profile der Serin-5-Phosphorylierung immer ein starkes Signal an der TSS, unabhängig ob die endogene oder die exogenen Polymerasen exprimiert wurden (Abb. 16). Die Untersuchung einzelner Gene konnte die Auswirkungen der Thr4/Ala-Mutante auf die genomweite Verteilung der Pol-II und ihrer CTD-Modifikationen nochmals verdeutlichen. Obwohl die Thr4/Ala-Zelllinien nach kurzer Zeit sterben, kann die Polymerase in dieser Mutante noch an Chromatin binden und auf bestimmten Genen starke Signale generieren (Abb. 17, ATF3, Pol-II).

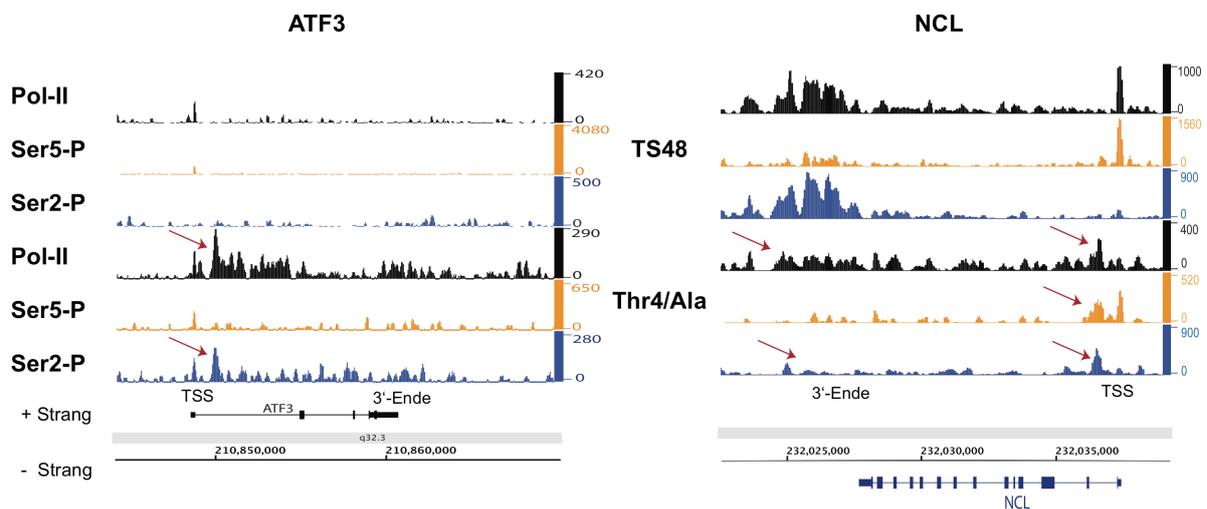


Abbildung 17: Die Expression der Thr4/Ala-Mutante verändert die genomweite Verteilung der Pol-II. ATF3 (*Activating transcription factor 3*) und NCL (*Nucleolin*) sind zwei repräsentative Gene, an denen die Unterschiede (rote Pfeile) in den ChIP-Seq-Bindungsprofilen für die Gesamte-, die Ser5-P- und die Ser2-P-Pol-II in TS48- und Thr4/Ala-Zelllinien deutlich werden. Die normalisierten ChIP-Seq-Signale sind für jeden Antikörper an der y-Achse angegeben. Unterhalb der ChIP-Seq-Profile ist die Lage des Gens auf dem positiven (+) oder negativen (-) Strang sowie die Transkriptionsstartstelle (TSS) als auch die RNA-Prozessierungsstelle (3'-Ende) erkennbar. Thr4/Ala-Mutanten können nach Induktion an das Chromatin binden und generieren in einigen Genen starke Signale. Die Thr4/Ala-Polymerasen können noch an Promotoren binden, werden aber kurz unterhalb der TSS blockiert, was auf einen Elongationsdefekt hindeutet.

Während die Serin-2-Phosphorylierung, einhergehend mit einer Verringerung der Pol-II-Menge, am 3'-Ende der Gene in der Thr4/Ala-Mutante abnimmt, bleibt die Serin-5-Phosphorylierung an der TSS nahezu unbeeinflusst (Abb. 17 und Anhang A3). Diese Ergebnisse deuten auf einen Elongationsdefekt der Thr4/Ala-Mutante hin, da diese Polymerasen anscheinend noch an die Promotoren binden und die Transkription initiieren können, kurz danach in der Elongation aber blockiert sind.

3.6 Charakterisierung einer mitosespezifischen Pol-II-Population

Die Säugetierkinase Plk1 (*Polo-like kinase1*) konnte als weitere potenzielle Threonin-4-spezifische CTD-Kinase *in vitro* nachgewiesen werden. Plk1 besitzt eine Ser/Thr-Kinase-Domäne und wird im Zellzyklus in erster Linie während der späten G2- und M-Phase exprimiert. Zahlreiche Prozesse in der Mitose werden durch diese Kinase reguliert (Lowery et al., 2005). Der nächste Schritt war herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der mitosespezifischen Plk1-Kinase und der CTD Threonin-4-Phosphorylierung der Pol-II *in vivo* besteht.

3.6.1. Lokalisation der Plk1-Kinase während des Zellzyklus

Um einen ersten Hinweis auf diese Frage zu erhalten wurde die Verteilung der Plk1-Kinase während des Zellzyklus analysiert. Hierzu wurden fixierte HeLa-Zellen mit einem Plk1-spezifischen Antikörper sowie dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert, die DNA mit DAPI gefärbt und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht (Abb. 18). Der Zellzyklus umfasst die Interphase, bestehend aus der G1-, S- und G2-Phase, sowie die M-Phase, die unterteilt wird in die Mitose, bestehend aus Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase, und die Zytokinese. Die Aufgabe der S-Phase ist die Replikation der chromosomalen DNA und die Duplikation der Centrosomen, wohingegen die Mitose der Weitergabe eines kompletten Chromosomensatzes der zuvor replizierten DNA an die Tochterzellen dient (Nigg, 2001). Der Eintritt in die Mitose ist abhängig von der Phosphorylierung und Aktivierung der Cdc25c Phosphatase, die ihrerseits den Komplex der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2/CyclinB aktiviert und dadurch den Übergang von der G2-zur M-Phase reguliert (Qian et al., 2001). Die Aktivierung der Cdc25c Phosphatase erfolgt nach der Bindung und anschließender Phosphorylierung durch die Plk1-Kinase (Toyoshima-Morimoto et al., 2002; Elia et al., 2003).

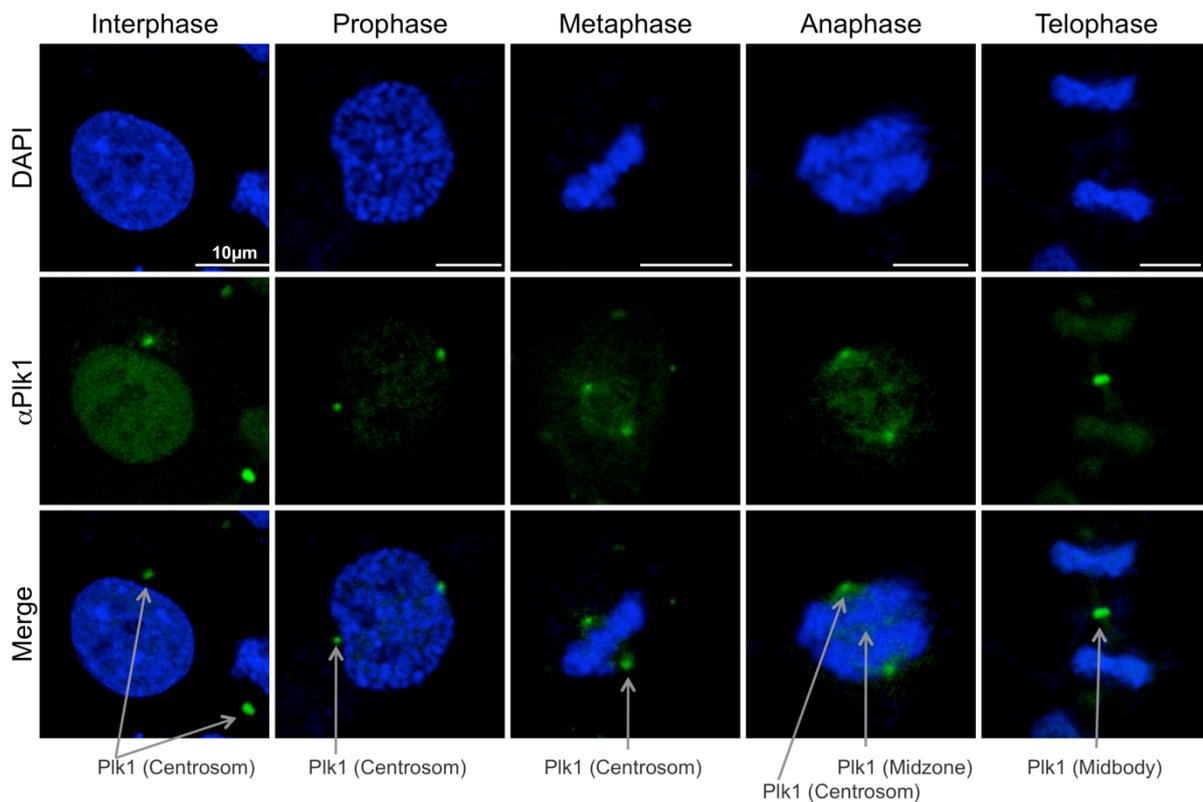


Abbildung 18: Zelluläre Lokalisation von Plk1 im Zellzyklus. Immunfluoreszenz-mikroskopische Überprüfung der Plk1 Lokalisation während des Zellzyklus in fixierten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit DAPI (blau) sowie dem α Plk1-Antikörper (grün) gefärbt und die Überlagerung beider Kanäle ist als Merge wiedergegeben. Maßstab, 10 μ m.

Die konfokalmikroskopische Analyse verdeutlicht eine transiente Lokalisation der Plk1-Kinase an verschiedene mitotische Komponenten während des Zellzyklus (Abb. 18). Der Plk1-Antikörper zeigt Reaktivitäten während der Interphase in den Zellkernen sowie an einem spezifischen Punkt im Cytoplasma, aber nicht in den Nukleoli. Der Punkt im Cytoplasma entspricht dem Centrosom, da die Plk1-Kinase in der Interphase auch an die Centrosomen lokalisiert (Kishi et al., 2009). In der Pro- und Metaphase sind Plk1-Signale im Zellplasma zu erkennen, der größte Anteil von Plk1 lokalisiert jedoch an den Centrosomen. Die Centrosomen sind cytoplasmatische Organellen die während der S-Phase verdoppelt werden und aus je zwei Centriolen, umgeben von einer dichten Proteinschicht, dem pericentriolaren Material, bestehen. Zu Beginn der Mitose separieren sich die Centrosomen und bilden in den Zellen die beiden Spindelpole (Kishi et al., 2009). Während der frühen Anaphase lässt sich bereits eine zusätzliche Anreicherung von Plk1 an der zentralen Spindel-Midzone erkennen und in der Telophase scheint Plk1 hauptsächlich an dem Midbody zu

lokalisieren (Abb. 18; Nigg, 2001; Kishi et al., 2009). Die Zentrale-Spindel, bestehend aus Bündeln von anti-parallel verlaufenden Mikrotubuli, bildet sich während der Anaphase zwischen den sich separierenden Chromosomen aus. Der während der Telophase entstehende Midbody bildet das Zentrum der cytoplasmatischen Brücke zwischen den sich teilenden Zellen und fungiert als Plattform für zahlreiche Faktoren, die an der vollständigen Abtrennung der Tochterzellen beteiligt sind (Steigemann und Gerlich, 2009).

3.6.2. CTD-Phosphorylierungen während der Mitose

In einem nächsten Schritt wurde die Lokalisation der Pol-II abhängig von ihrer jeweiligen CTD-Phosphorylierung während der Mitose in Zellen untersucht. Dazu wurden fixierte HeLa-Zellen mit je einem phosphorylierungsspezifischen Primärantikörper und dem Pol3.3.-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern verschiedener Spezies kofärbt und die DNA mit DAPI gegen gefärbt. Danach wurden die Zellen konfokal-mikroskopisch untersucht. Eine Zelle in der Metaphase ist als repräsentatives Beispiel dargestellt (Abb. 19).

Während der Metaphase liegt das Chromatin vollständig kondensiert vor und die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. Die Pol-II ist nicht mehr an das Chromatin gebunden und befindet sich jetzt im Zellplasma (Abb. 19, α Rpb1). Die drei Serin-phosphorylierungsspezifischen Antikörper (α Ser2-P, α Ser5-P und α Ser7-P) erkennen Pol-II im Zellplasma ähnlich gut, ein Hinweis, dass alle drei Modifikationen der CTD während der Mitose nicht verloren gehen.

Mit dem Phosphothreonin-4-Antikörper (Klon 6D7) kann während der Mitose dagegen ein starkes Signal an zwei Stellen zu beiden Seiten der Metaphaseplatte nachgewiesen werden (Abb. 19, α Thr4-P). Die Analyse der weiteren Mitosestadien ergab, dass ausschließlich der α Thr4-P-Antikörper immer zwei Punkte im Cytoplasma erkennt (Daten nicht gezeigt).

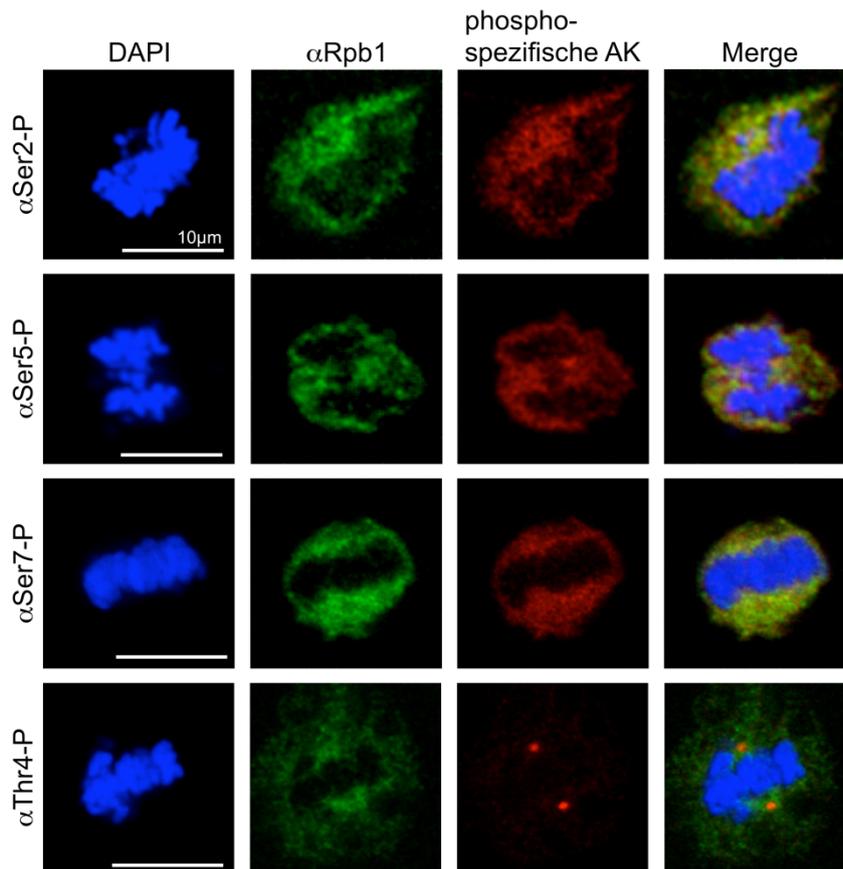


Abbildung 19: Immunfluoreszenzen der phosphorylierungsspezifischen CTD-Antikörper während der Metaphase. Um den Phosphorylierungsstatus der CTD der Pol-II während der Metaphase zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen sowohl mit dem Pol3.3.-Antikörper (grün), als auch den Antikörpern gegen die verschiedenen Modifikationen (rot) angefärbt. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen mit der DNA (blau) ist rechts dargestellt (Merge). In mitotischen Zellen zeigt nur der Phosphothreonin-4-Antikörper starke Reaktivitäten an zwei definierten Arealen im Cytoplasma. Maßstab, 10µm.

3.6.3. Charakterisierung der Threonin-4-Phosphorylierung während der Mitose

Um die Frage zu beantworten, ob Pol-II spezifisch während der Mitose an Centrosomen assoziiert ist, wurde die Lokalisation des Enzyms in mitotischen Zellen untersucht. Hierzu wurden Kofärbungen unter Verwendung zweier spezifischer Polymerase-Antikörper (Pol3.3. und 8WG16) mit dem Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 in fixierten HeLa-Zellen durchgeführt und unter dem Konfokal-Mikroskop analysiert (Abb. 20A). Der 8WG16-Antikörper dient als weitere Kontrolle und erkennt sowohl unphosphorylierte als auch Threonin-4-phosphorylierte Pol-II. Tatsächlich können spezifische Signale für den 8WG16- und Pol3.3.-Antikörper zu beiden Seiten der Metaphasechromosomen nachgewiesen werden.

Ergebnisse

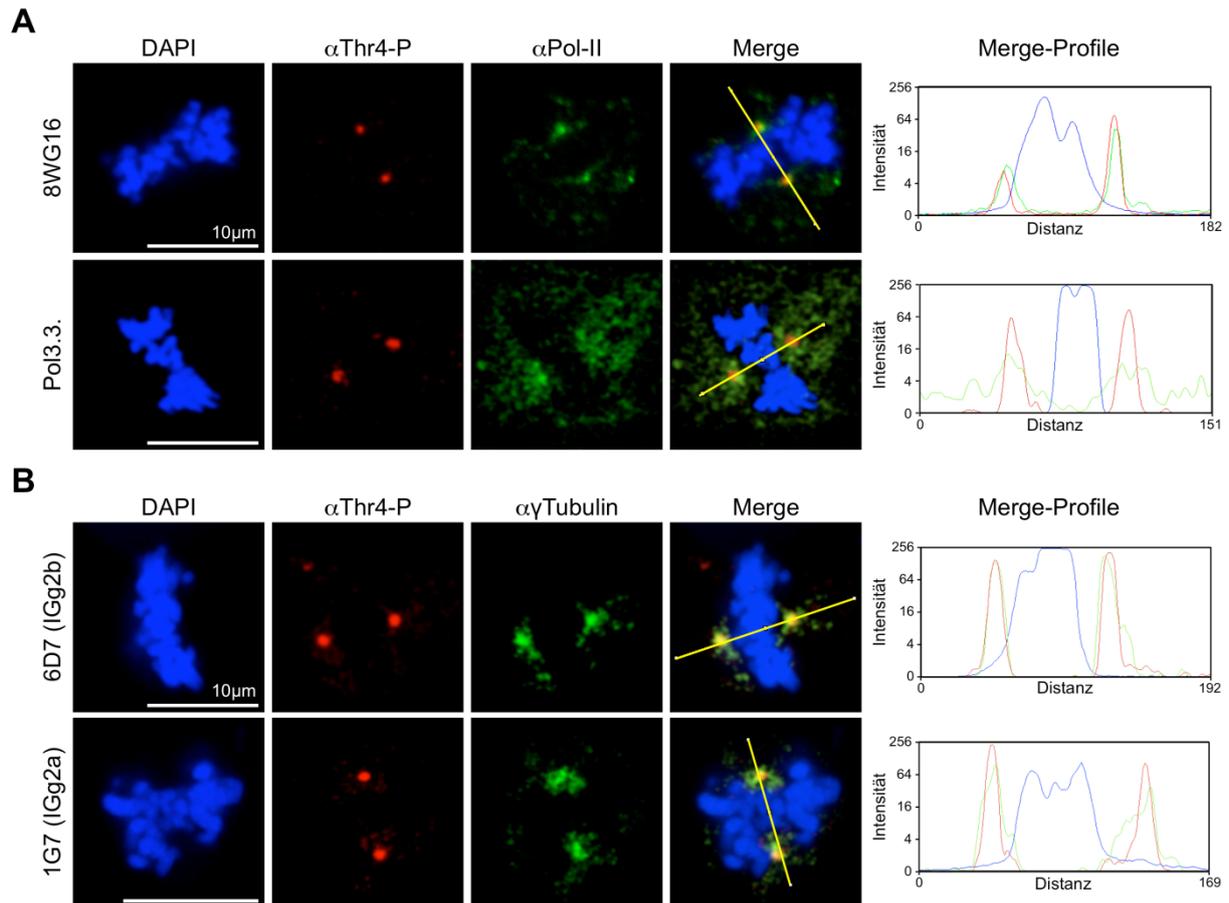


Abbildung 20: Threonin-4-phosphorylierte Pol-II lokalisiert während der Mitose an den Centrosomen. (A) Immunfluoreszenzen der Kofärbung der Threonin-4-Phosphorylierung (6D7, rot) mit zwei spezifischen Pol-II-Antikörpern (8WG16 und Pol3.3., grün) in HeLa-Zellen. (B) Kofärbung des γ -Tubulin-Antikörpers (Centrosomenmarker, grün) mit den beiden Phosphothreonin-4-Antikörpern (6D7 = gamma-2b und 1G7 = gamma-2a). Die Fluoreszenzbilder der entsprechenden Antikörper wurden mit der DNA (blau) übereinandergelegt und mit dem Programm ImageJ (Plug in RGB profiler) die Kolo-kalisation graphisch dargestellt (Merge-Profile). Die y-Achse entspricht den Werten der Fluoreszenz-Intensitäten, die in einer logarithmischen Skala von 2 wiedergegeben sind. Für jede Kofärbung ist eine Metaphase-Zelle als repräsentatives Ergebnis abgebildet. Maßstab, 10 μ m.

Die Kolo-kalisation der Threonin-4-Phosphorylierung mit beiden Polymerase-Antikörpern konnte nachgewiesen werden, indem die jeweils entsprechenden Fluoreszenzbilder übereinandergelegt wurden. Im Vergleich zu den Pol3.3.-Signalen sind die Signale des 8WG16-Antikörpers wesentlich eindeutiger an genau zwei Punkten im Cytoplasma erkennbar (Abb. 20A). Der Grund dafür ist eine Permeabilisierung der Membran vor der Fixierung, wodurch alle ungebundene Pol-II aus den Zellen gewaschen werden kann. Die Überschneidung der Threonin-4-Phosphorylierungssignale mit denen des 8WG16-Antikörpers konnte an zwei

definierten Punkten für alle Phasen der Mitose gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisation der Threonin-4-phosphorylierten Pol-II an Centrosomen während der Mitose konnte mit einem Centrosomenmarker gezeigt werden. Hierzu wurden fixierte HeLa-Zellen mit den Phosphothreonin-4-Antikörpern 6D7 (Subklasse gamma-2b) und 1G7 (Subklasse gamma-2a) sowie dem Centrosomenmarker γ -Tubulin gemeinsam angefärbt und anschließend konfokalmikroskopisch analysiert (Abb. 20B). Für beide Phosphothreonin-4-Antikörper (die zu verschiedenen Subklassen gehören) kann eine Kolokalisation mit dem γ -Tubulin-Antikörper, der ausschließlich Centrosomen anfärbt, nachgewiesen werden (Abb. 20B).

3.6.4. Lokalisation von Plk1 und Threonin-4-phosphorylierter Pol-II im Zellzyklus

Nachdem die Existenz einer spezifischen Phosphothreonin-4-modifizierten Pol-II-Population während der Mitose an den Centrosomen beobachtet werden konnte und die Plk1-Kinase die Pol-II spezifisch an der Aminosäure Threonin-4 der CTD *in vitro* phosphorylieren kann, war der nächste Schritt herauszufinden, in welchem Zusammenhang diese CTD-Modifikation und die Plk1-Kinase während der Mitose stehen. Zu diesem Zweck wurden Kofärbungen mit dem Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 und dem Plk1-Antikörper in fixierten HeLa-Zellen durchgeführt. Die Proteine wurden durch unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht, die DNA mit DAPI gegen gefärbt und jede Phase des Zellzyklus konfokalmikroskopisch analysiert. Die Kolokalisation der Threonin-4-Phosphorylierungs- und der Plk1-Signale wurde mit dem Programm ImageJ (Plug in RGB profiler) ausgewertet (Abb. 21). Während der Interphase sind die Signale des Phosphothreonin-4-Antikörpers hauptsächlich auf dem dekondensierten Chromatin und unter Aussparung der Nukleoli verteilt. Der Plk1-Antikörper weist in dieser Phase ebenfalls Reaktivität gegen den Zellkern, aber nicht für Nukleoli, auf und färbt zusätzlich das Centrosom an, das in der S-Phase verdoppelt wird. In der Interphase scheint das Centrosom keine Reaktivität gegen den Phosphothreonin-4-Antikörper zu zeigen. In der Prophase, in der es zu einer Verdichtung des Chromatins kommt, befindet sich bereits keine Threonin-4-phosphorylierte Pol-II mehr gebunden an Chromatin. Es zeigt sich aber bereits eine Kolokalisation mit den Plk1-Signalen, jedoch nur an einem der zwei von Plk1 angefärbten Arealen im Cytoplasma. Da Plk1 an die Centrosomen lokalisiert (Kishi et al., 2009) und eine Kolokalisation der

Ergebnisse

Threonin-4-phosphorylierten Pol-II mit dem Centrosomenmarker γ -Tubulin gezeigt werden konnte (Abb. 20B), entsprechen diese beiden Punkte im Cytoplasma den Centrosomen.

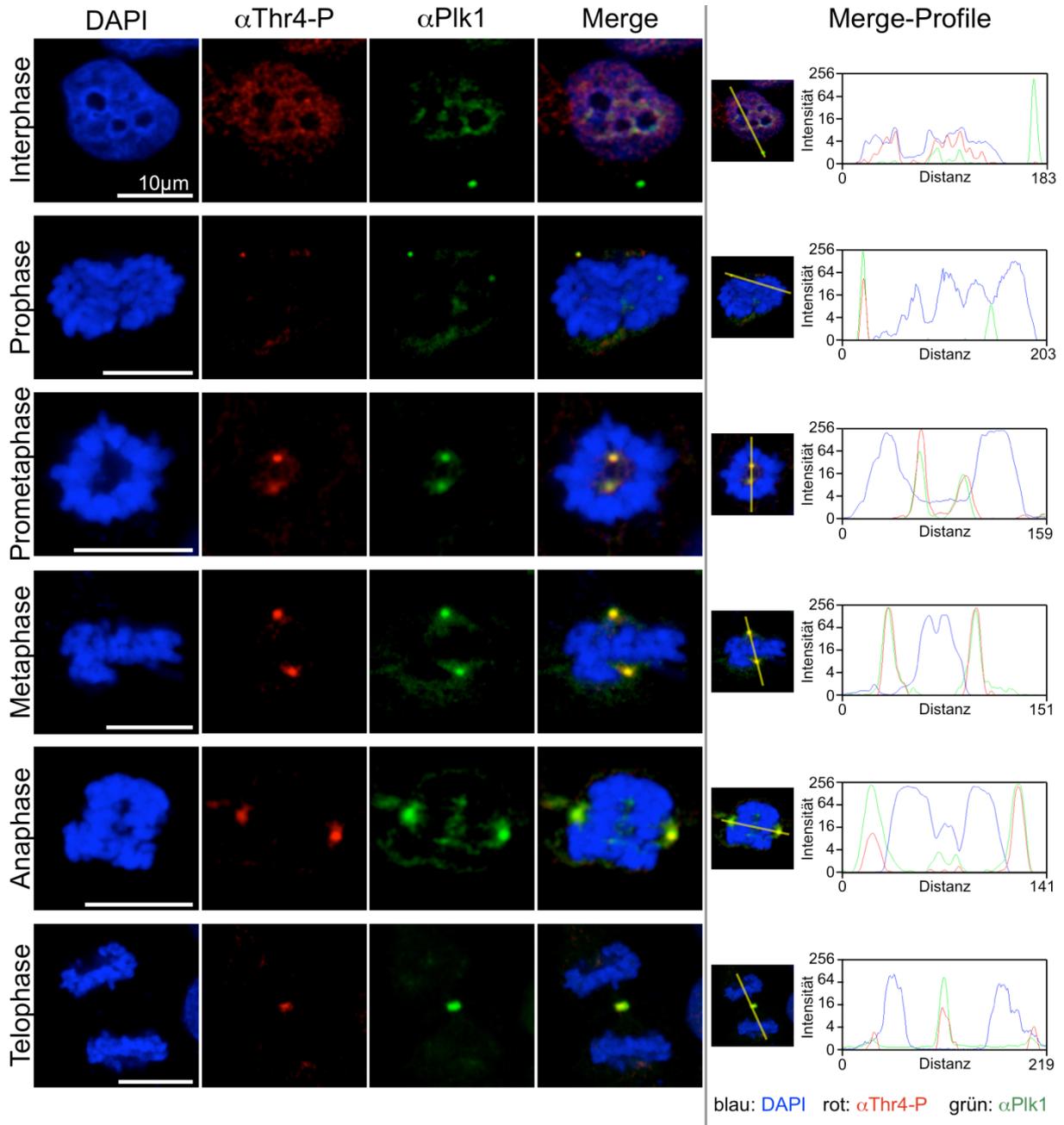


Abbildung 21: Plk1 und Threonin-4-Phosphorylierung kolokalisieren im Zellzyklus. HeLa-Zellen wurden sowohl mit dem Plk1-Antikörper (grün) als auch dem Phosphothreonin-4-Antikörper (6D7, rot) angefärbt und mittels Konfokal-Mikroskopie analysiert. Um mögliche Kolokalisationen (gelb/orange) der beiden Antikörper nachzuweisen, wurden die beiden Fluoreszenzen mit DAPI (blau) übereinander gelegt (Merge). Die graphische Veranschaulichung wurde mit dem Programm ImageJ (Plug in RGB profiler) dargestellt. Der Plk1- und der Phosphothreonin-4-Antikörper zeigen starke Reaktivitäten während der Mitose an den Centrosomen und dem Midbody. Maßstab, 10 μ m.

Sowohl in der Prometaphase, in der es zur Auflösung der Kernhülle kommt, als auch während der Metaphase, in der sich die Chromosomen in der Äquatorialebene anordnen, zeigen beide Antikörper starke Reaktivitäten spezifisch an zwei Punkten im Zellplasma und scheinen an die Centrosomen zu binden. Im nächsten Abschnitt des Zellzyklus, der Anaphase, kommt es zur Trennung der Chromatiden und anschließender Wanderung der Chromosomen an die Spindelpole der Zelle. Zu diesem Zeitpunkt der Zellteilung weisen die Phosphothreonin-4-Signale ausschließlich eine Lokalisation an den Centrosomen auf, wohingegen der Plk1-Antikörper bereits eine zusätzliche Reaktivität gegen die zentrale Spindel-Midzone zwischen den sich trennenden Chromosomen zeigt. Die Intensitäten der Phosphothreonin-4- und der Plk1-Signale nehmen während der Telophase an den Centrosomen ab und zeigen stattdessen eine Anreicherung im Zentrum der cytoplasmatischen Brücke dem sogenannten Midbody an. Die Telophase stellt den letzten Schritt der Mitose dar und dient der Dekondensation der Chromosomen und der Ausbildung der beiden Tochterzellkerne. Diese Daten zusammen betrachtet bestätigen, dass die Kinase Plk1 und eine Subpopulation der Threonin-4-phosphorylierten Pol-II während der Mitose an den gleichen zellulären Strukturen wie den Centrosomen und dem Midbody lokalisieren.

3.6.5. Auswirkung der Plk1-Hemmung auf die CTD-Phosphorylierungen

Um zu testen, ob es sich bei der Plk1-Kinase, die *in vitro* die CTD an der Aminosäure Threonin-4 phosphorylieren kann, auch *in vivo* um eine CTD-Kinase handelt, wurden siRNA-Knockdown-Experimente in HeLa-Zellen durchgeführt. Die Expression der Plk1-Kinase wurde mit Hilfe von siRNA gehemmt. Die Wirkung des Knockdowns auf die CTD-Phosphorylierung wurde mittels Western-Analyse untersucht (Abb. 22). Die Verringerung der Expression der Plk1-Kinase um ca. 80% zeigt im Vergleich zu Kontrollzellen nahezu keinen Effekt auf die verschiedenen CTD-Phosphorylierungslevel. Der Plk1-Knockdown führt aber zu einer Abnahme der gesamten Pol-II-Menge (Abb. 22, α Rpb1), während die Ladungskontrolle (α Tubulin) keine Unterschiede aufweist. Auch der Knockdown von Pes1 und die Verminderung von Pes1 auf ca. 50% hat keine Auswirkungen auf den Proteinlevel von Pol-II (Abb. 22, Spur 3). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Plk1 mit p53 interagiert und dadurch die Apoptose-induzierende Aktivität von p53 inhibiert (Ando et al., 2004).

Ergebnisse

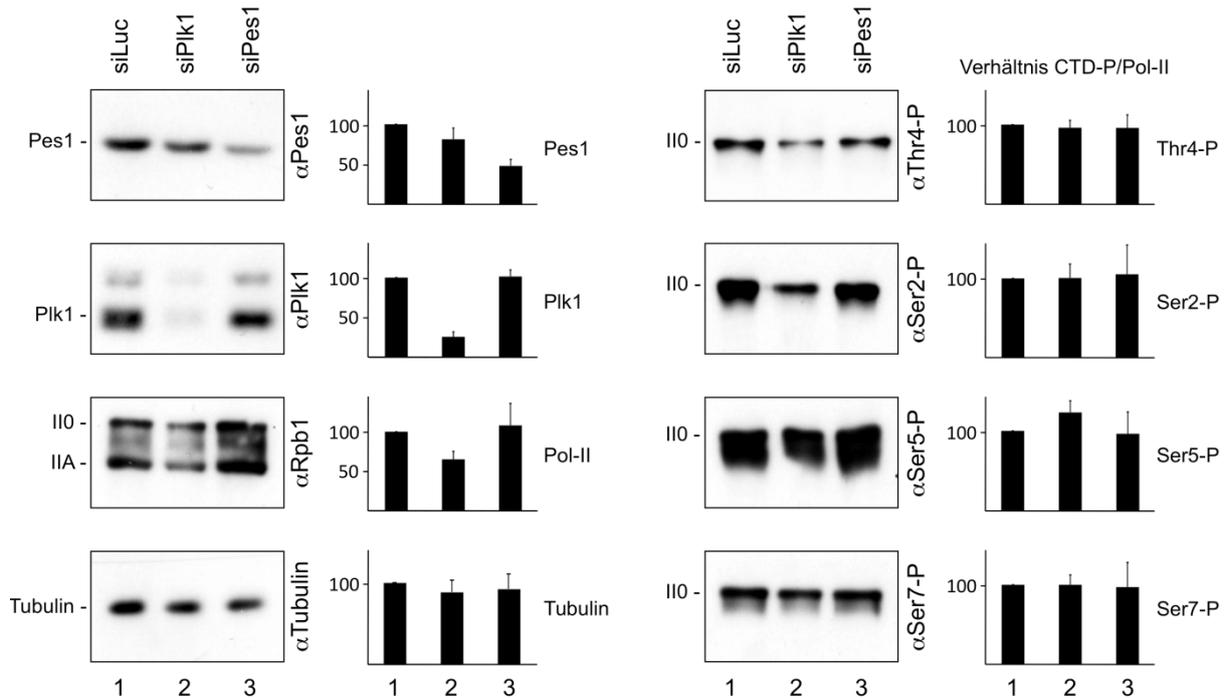


Abbildung 22: Hemmung der Expression der Plk1-Kinase. Western-Analyse nach siRNA-Knockdown von Plk1 in HeLa-Zellen. Die Expression der Plk1-Kinase wurde für 24 Stunden mit einer siRNA gehemmt und die Auswirkungen auf die verschiedenen CTD-Phosphorylierungen wurden in Gesamtzell-Extrakten untersucht. Die Signal-Intensitäten aller Antikörper wurden quantifiziert (AIDA) und sind graphisch dargestellt. Es erfolgte eine Normierung der quantifizierten Phosphorylierungs-Intensitäten gegen die des Pol3.3.-Antikörpers. Anschließend wurden die quantifizierten Werte aller Proteine auf die der Luciferase siRNA normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Versuchsdurchführungen mit deren Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die y-Achse entspricht den normierten Signal-Intensitäten (in Prozent) des jeweiligen Proteins. SiPlk1 reduziert den Plk1-Proteinlevel um ca. 80% im Vergleich zu Kontrollzellen. Dies führt zu einer Abnahme der Pol-II-Menge, hat aber kaum Effekte auf den CTD-Phosphorylierungslevel.

Demzufolge könnte ein Grund für die Abnahme der Pol-II in Zellen mit herabreguliertem Plk1-Proteinlevel eine bereits eingeleitete Apoptose sein. Dies korreliert sehr gut mit der Beobachtung, dass 48 Stunden nach Plk1-Knockdown fast alle Zellen abgelöst im Medium schwimmen (Daten nicht gezeigt). Obwohl Plk1 die CTD spezifisch an Threonin-4 *in vitro* phosphorylieren kann, konnte keine Abnahme des Threonin-4-Phosphorylierungslevels nach Knockdown dieser Kinase in den Gesamtzell-Extrakten *in vivo* festgestellt werden. Diese Experimente ermöglichen jedoch keine Aussage darüber, ob die restlichen 20% der Kinase-Moleküle zur Aufrechterhaltung der Threonin-4-Phosphorylierung ausreichen oder ob Plk1 die CTD vor allem nur während der Mitose phosphoryliert. Die Plk1-Kinase und die Phosphothreonin-4-modifizierte Pol-II kolokalisieren während der Mitose spezifisch

an den Centrosomen und dem Midbody. Aus diesem Grund könnte Plk1 eventuell ausschließlich für die Phosphorylierung dieser relativ kleinen Subpopulation an Pol-II verantwortlich sein. Dieser Umstand könnte erklären, warum keine Effekte auf den Threonin-4-Phosphorylierungslevel des gesamten Polymerase-Pools nach Knockdown von Plk1 zu erkennen sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden siRNA-Knockdown-Experimente und Immunfluoreszenz-Analysen in HeLa-Zellen kombiniert. Hierzu wurde die Expression der Plk1-Kinase für 24 Stunden gehemmt, die Zellen anschließend mit PFA fixiert und mit dem Plk1- sowie dem Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 inkubiert. Die Proteine wurden durch unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht, die DNA mit DAPI gefärbt und konfokalmikroskopisch analysiert (Abb. 23). Die siRNA gegen Luciferase dient als Kontrolle, um mögliche Effekte auf Grund der Transfektion einer siRNA ausschließen zu können. Die Färbung des Chromatins mit DAPI lässt nach Plk1-Knockdown eine stark erhöhte Anzahl an Zellen mit fragmentierten Zellkernen (→) im Vergleich mit den Luciferase-transfizierten Zellen erkennen (Abb. 23A). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Induktion von Apoptose, da ein typisches Merkmal für diesen Vorgang eine Zellkern-Fragmentierung ist. Der Plk1-Antikörper weist nahezu keine Reaktivität in den Zellen mit fragmentierten Zellkernen auf (Abb. 23A, siPlk1). Eine mögliche Erklärung für die Plk1-Signale in den noch intakten Interphase-Zellkernen könnte der nicht vollständige Kinase-Knockdown nach 24 Stunden sein. Die Luciferase-transfizierten Zellen zeigen alle verschiedenen Phasen des Zellzyklus und die entsprechende Lokalisation von Plk1 konnte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führt der Knockdown von Plk1 zu zahlreichen apoptotischen Zellkernen und nur sehr wenige normale Mitoseformen konnten beobachtet werden. Die Kofärbung von Plk1 und Phosphothreonin-4 in Zellen nach Plk1-Knockdown verdeutlicht, dass in den noch vorhandenen normalen Mitosen der Prometa- und der Metaphase keine Reaktivitäten der Antikörper gegen beide Proteine an den Centrosomen vorhanden sind (Abb. 23B). Diese Daten zeigen, dass der Knockdown der Plk1-Kinase einen drastischen Effekt auf die Viabilität der Zellen einhergehend mit einer dadurch eingeleiteten Apoptose hat. Es ist jedoch keine Aussage darüber möglich, ob das Verschwinden der Threonin-4-Phosphorylierungssignale an den Centrosomen direkt durch den Verlust der Kinase oder vielleicht indirekt durch Aktivierung einer spezifischen Phosphatase verursacht wird.

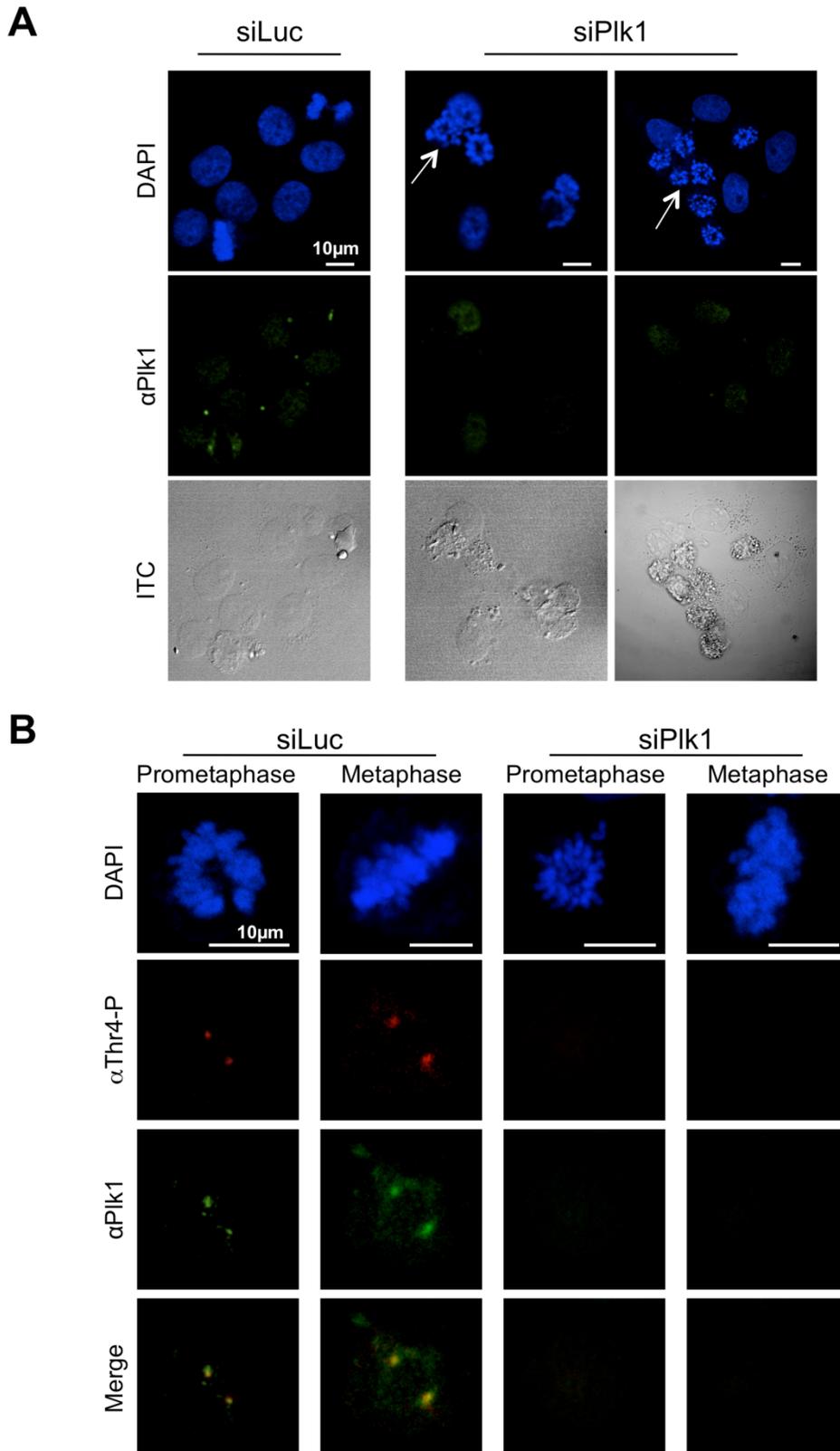


Abbildung 23: Immunfluoreszenzen nach Plk1-Knockdown in HeLa-Zellen. 24 Stunden nach Hemmung der Plk1-Kinase wurden die Zellen mit DAPI (blau), dem Plk1- (grün) sowie dem Phosphothreonin-4-Antikörper (6D7, rot) angefärbt. **(A)** SiPlk1 führt zu einer starken Zunahme an fragmentierten Zellkernen (weiße Pfeile). **(B)** SiPlk1 führt zu einem Verlust der Phosphothreonin-4-Antikörper Reaktivität in mitotischen Zellen. Maßstab, 10µm.

3.6.6. Plk1 ist in einem Komplex mit Threonin-4-phosphorylierter Pol-II

Die Kolokalisation der Plk1-Kinase mit einer Threonin-4-phosphorylierten Pol-II-Population während der Mitose sowie ein Verlust dieser CTD-Modifikation an den Centrosomen nach siRNA-Knockdown von Plk1 konnte nachgewiesen werden. Folglich war der nächste Schritt herauszufinden, ob die Plk1-Kinase und Pol-II einen Komplex *in vivo* bilden. Hierzu wurden mithilfe der verschiedenen monoklonalen CTD-Antikörper und einem spezifischen Polymerase-Antikörper (N20) Immunpräzipitationen (IP) in Gesamtzell-Extrakten von HeLa-Zellen durchgeführt. Die Präzipitate wurden in einer Western-Analyse untersucht, ob sie Plk1 ko-präzipitieren konnten (Abb. 24). Alle Antikörper eignen sich für die IP und zeigen für die jeweils eigene IP positive Signale in der Western-Analyse. Zur Überprüfung der IP-Effizienz wurde der Überstand (ÜS), der das Gesamtzell-Extrakt nach der IP darstellt, als Kontrolle mitgeführt. Vergleicht man die Signale in der IP-Spur mit den Signalen des Inputs sowie des Überstands, dann zeigt sich, dass nur der Pol-II-Antikörper N20 eine verringerte IP-Wirksamkeit von ungefähr 50% im Vergleich zu den anderen Antikörpern aufweist. Alle CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper können die Pol-II präzipitieren, wobei auch der Phosphothreonin-4-Antikörper die Pol-II₀-Form quantitativ präzipitiert (Abb. 24, α Rpb1, Spur 2). Der Plk1-Antikörper zeigt in der Phosphothreonin-4-IP-Spur eine schwache Reaktivität (Abb. 24, C, Stern), jedoch nicht für die IPs der anderen CTD-Phosphorylierungen (Abb. 24, D – F, Spur 2). Obwohl der Plk1-Antikörper sich sehr gut für die IP eignet, konnten in der Western-Analyse keine Signale für eine Threonin-4-Phosphorylierung in der Plk1-IP nachgewiesen werden. Dennoch erschienen in der Immun-Detektion der großen Untereinheit Rpb1 schwache, aber spezifische Signale auf Höhe der Pol-II₀-Bande in der Plk1-IP (Abb. 24, A, Stern). Da die Kolokalisation von Plk1 und Threonin-4-phosphorylierter Pol-II während der Mitose nachgewiesen werden konnte, wurden die Tandem-Immunpräzipitationen in chemisch-synchronisierten Zellen nochmals wiederholt. Nocodazol ist ein chemischer Inhibitor, der die Polymerisation der Mikrotubuli unterbindet. Die Zellen können noch in die Mitose gehen, aber nicht mehr die Metaphase-Spindel ausbilden, wodurch die Zellen in der Prometaphase arretiert werden und eine Synchronisation der Zellen erfolgt. Durch Zugabe von Nocodazol (20ng/ml) für acht Stunden in das Zellmedium wurden HeLa-Zellen synchronisiert und anschließend durch Abklopfen von den adhären, nicht-synchronisierten Zellen getrennt.

Ergebnisse

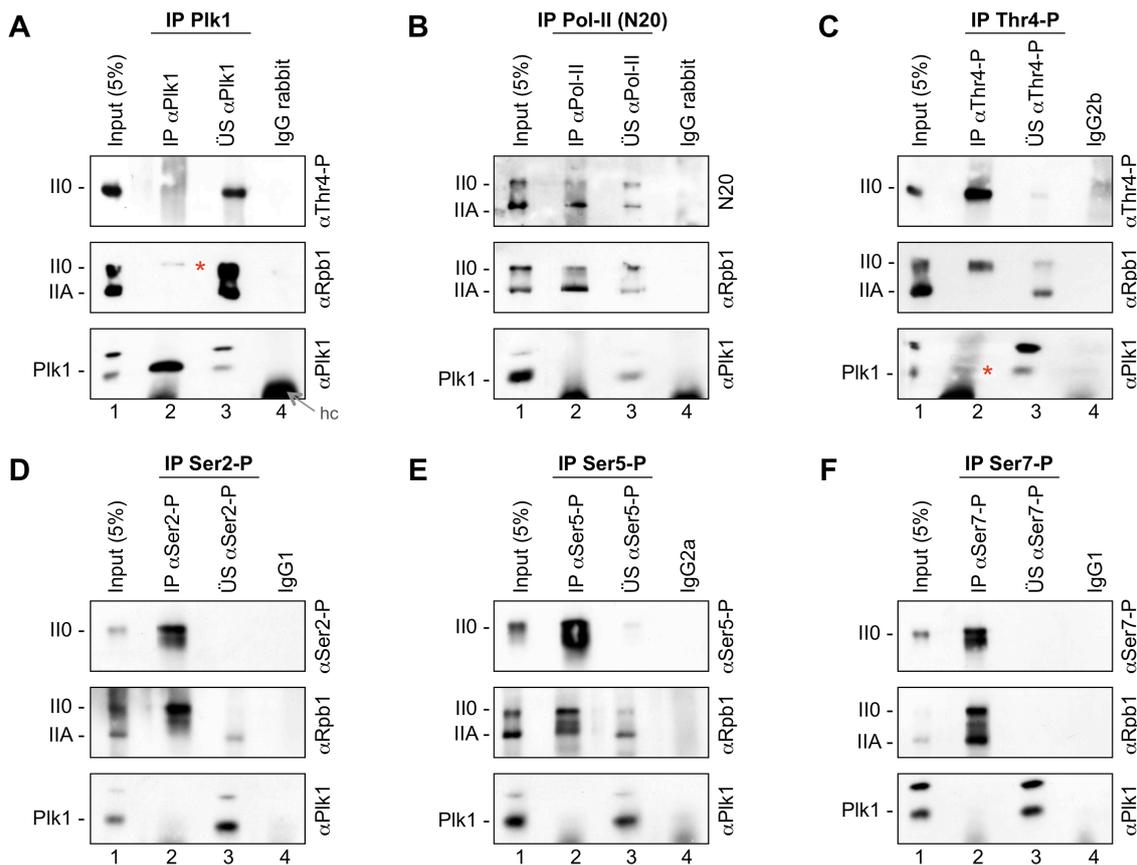


Abbildung 24: Ko-IPs in asynchronen HeLa-Zellen. Untersuchung der verschiedenen CTD-Phosphorylierungen auf ihre Fähigkeit, die Plk1-Kinase zu präzipitieren mittels Western-Analyse nach Immunpräzipitation. Die Markierungen kennzeichnen die beiden Polymerase-Formen (IIO und IIA), die Plk1-Bande und die schweren Ketten (hc) der Antikörper. Der Antikörper Pol3.3. zeigt eine schwache, aber dennoch spezifische Reaktivität gegen die Pol-II0-Form in der Plk1-IP (*). Der Plk1-Antikörper zeigt in der Phosphothreonin-4-IP-Spur eine schwache Reaktivität (*), jedoch nicht für die IPs der drei Serinphosphorylierungsspezifischen Antikörper.

Aus diesen Gesamtzell-Extrakten wurden Immunpräzipitationen mit den gleichen Antikörpern wie zuvor durchgeführt und diese wiederum mittels Western-Analyse auf ihre Fähigkeit, Plk1 zu präzipitieren, untersucht (Abb. 25). Um die Ergebnisse der IPs aus den asynchronen mit denen der Nocodazol-synchronisierten Zellen vergleichen zu können, wurden jeweils die gleichen Zellzahlen pro IP und in der anschließenden Western-Analyse eingesetzt. Der Pol3.3.-Antikörper färbt in der Plk1-IP eine schwache Bande auf der Höhe der Pol-II0-Form an (Abb. 25, A, Stern). Auch unter Verwendung von mitose-arretierten Zellen können keine Threonin-4-Phosphorylierungssignale in der Plk1-IP festgestellt werden (Abb. 25, A, α Thr4-P, Spur 2).

Ergebnisse

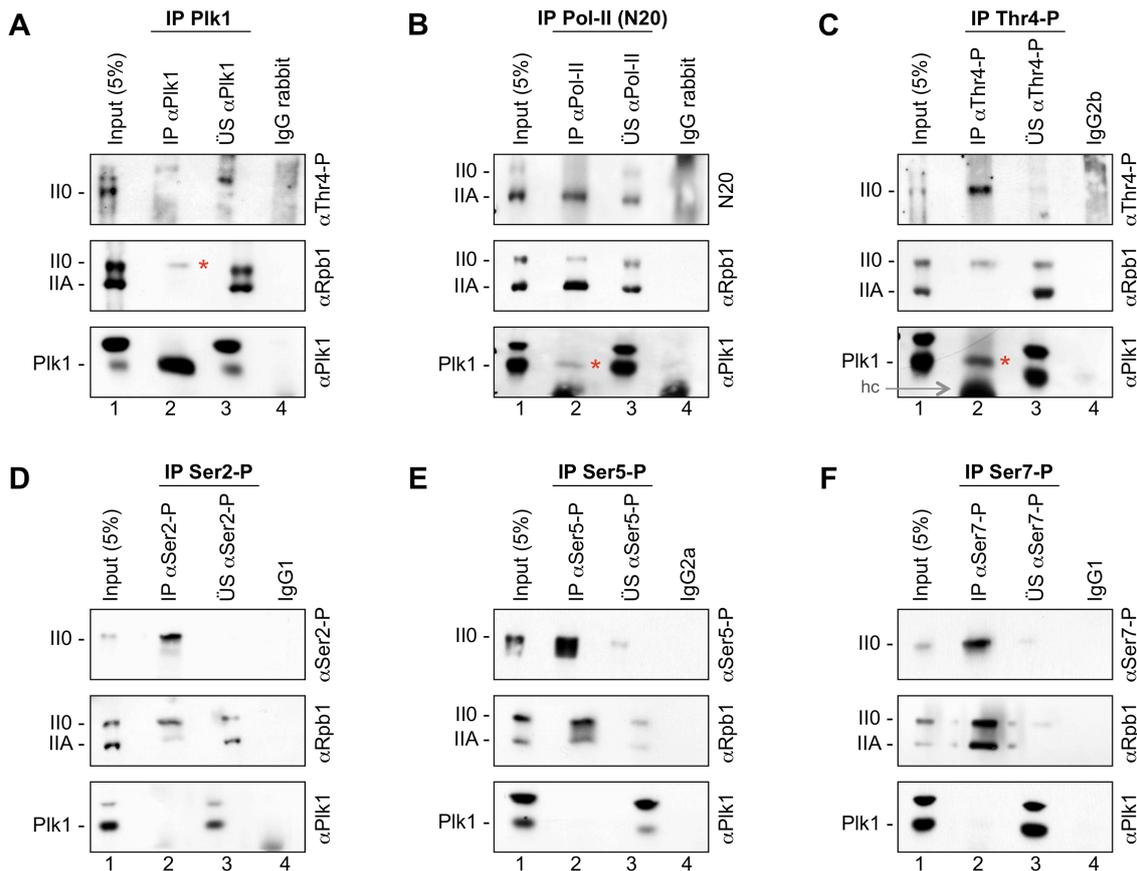


Abbildung 25: Plk1 und Threonin-4-phosphorylierte Pol-II bilden einen Komplex *in vivo*. Western-Analyse von Ko-Immünpräzipitationen der Plk1-Kinase und der CTD-Phosphorylierungen in Nocodazol-synchronisierten HeLa-Zellen. Die beiden Polymerase-Formen (I10 und IIA), die Plk1-Bande sowie die schwere Kette (hc) sind angezeichnet. Der Pol3.3.-Antikörper zeigt eine schwache, aber dennoch spezifische Reaktivität gegen die Pol-I10-Form in der Plk1-IP (*) Der Plk1-Antikörper erkennt eine Bande für Plk1 in der Phosphothreonin-4- und der Pol-II-IP (*), jedoch nicht in den anderen CTD-Phosphorylierungs-IPs.

Interessanterweise zeigt der Plk1-Antikörper jetzt aber eine sehr eindeutige Reaktivität in der Phosphothreonin-4- und der spezifischen Polymerase-IP auf Höhe der Plk1-Bande (Abb. 25, B und C, Stern). Die Präzipitation der Plk1-Kinase kann in keiner der anderen drei Phosphoserin-spezifischen-IPs nachgewiesen werden (Abb. 25, D - F). Aus diesen Ergebnissen lassen sich verschiedene Erkenntnisse ableiten. Die Plk1-Kinase kann spezifisch die transkribierende Pol-I10-Form präzipitieren. Des Weiteren kann nur eine Pol-II mit spezifischer Threonin-4-Phosphorylierung der CTD Plk1 präzipitieren, wobei diese Interaktionssignale durch Anreicherung der mitotischen Zellen verstärkt werden können. Diese Resultate bestätigen die Existenz eines Komplexes bestehend aus der Plk1-Kinase und einer Threonin-4-phosphorylierten Pol-II, der während der Mitose auftritt.

4. Diskussion

Die differenzielle Genexpression ist grundlegend für die Entwicklung eines Organismus und für die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen. Höhere Eukaryoten können durch Nutzung unterschiedlicher Promotoren und alternatives Spleißen eine große Vielzahl an Proteinen aus einem relativ kleinen Genpool erzeugen (Munoz et al., 2010). Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen spielen hierbei eine zentrale Rolle. Diese Enzyme sind früh in der Evolution entstanden und haben sich seitdem strukturell und funktionell weiterentwickelt. In Prokaryoten werden alle Gene von einer einzigen RNA-Polymerase in RNA-Moleküle überschrieben. In höheren Eukaryoten erfolgt die Transkription der Gene dagegen von drei RNA-Polymerasen (Pol-I, -II, -III) mit distinkter Funktion. Eine wichtige Errungenschaft höherer Eukaryoten ist die Regulation von transkriptionellen und kotranskriptionellen Vorgängen durch differenzielle Phosphorylierung der CTD der Pol-II. Während des Transkriptionszyklus ist das Phosphorylierungsmuster der CTD dynamisch, wodurch die Initiation der Transkription, die Elongation, die Prozessierung der entstehenden RNA-Transkripte als auch die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Faktoren reguliert werden (Phatnani und Greenleaf, 2006).

Die Serin-2-, Serin-5- und Serin-7-Phosphorylierung der CTD ist in Bezug auf den Zeitpunkt des Auftretens im Transkriptionszyklus und der Funktion bereits gut charakterisiert. Die Serin-5-Phosphorylierung ist wichtig für die Transkriptions-Initiation, die Serin-2-Phosphorylierung für die Elongation und die Serin-7-Phosphorylierung spielt eine wichtige Rolle bei der 3'-snRNA Prozessierung.

In dieser Arbeit wurde mittels monoklonaler Antikörper die Phosphorylierung von Threonin-4 erstmals *in vivo* als weitere Modifikationsmöglichkeit der CTD näher beschrieben. Die Threonin-4-Phosphorylierung tritt erst sehr spät im Transkriptionszyklus im 3'-Bereich von Genen auf. CTD-Mutanten-Analysen zeigten jedoch, dass Threonin-4 bereits während der Elongationsphase eine wichtige Rolle spielt. Die Phosphorylierung von Threonin-4 konnte Zellzyklus-abhängig nachgewiesen werden. Die Threonin-4-phosphorylierte Pol-II assoziiert in der Mitose an Centrosomen. Welche Funktion Pol-II während der Mitose erfüllt und ob diese Form der Pol-II transkriptionsaktiv ist, gilt es in weiterführenden Experimenten zu erkunden.

4.1 Bedeutung einzelner Aminosäuren der CTD-Konsensussequenz

Die CTD verschiedener Organismen zeigt Unterschiede sowohl in der Länge als auch in der Aminosäuresequenz der Heptapeptide. Die allgemeine Struktur von Siebener-Wiederholungen wurde aber über alle Organismen hinweg beibehalten. Trotz der starken Konservierung der Konsensussequenz YSPTSPS lässt sich ein unterschiedlicher funktioneller Bedarf an bestimmten Aminosäureresten in verschiedenen Organismen erkennen (Chapman et al., 2008). Die CTD der Hefe kann durch die CTD von Säugetieren ersetzt werden, ohne dass dadurch die Viabilität oder Funktionalität beeinflusst wird (Allison et al., 1988). In Säugetieren wird dagegen der Austausch der CTD mit einer reinen Konsensus-CTD gleicher Länge zwar toleriert, reduziert aber etwas die Zellviabilität in der verwendeten B-Zelllinie (Chapman et al., 2005). Die Nicht-Konsensus-Wiederholungen der CTD sind innerhalb der Säugetiere zu 100% konserviert und lassen eine wichtige Funktion vermuten. So führt der Austausch einer einzelnen Aminosäure (Arginin-1810 zu Alanin) im Nicht-Konsensus-Repeat 31 der Säugetier-CTD zu einer Überproduktion von zahlreichen snRNAs und snoRNAs (Sims et al., 2011). Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass HEK293-Zellen mit einer rekombinanten Pol-II eine hohe Viabilität aufweisen, auch dann wenn die Sequenz der CTD ausschließlich aus 48 Konsensus-Wiederholungen besteht. Die Nicht-Konsensus-Heptapeptide scheinen somit nicht essenziell für die Zellviabilität zu sein, sondern dienen wahrscheinlich der Effizienz-Optimierung der Pol-II. Die Nicht-Konsensus-Wiederholungen könnten für die Expression spezifischer Gene oder die Reaktionen auf zellulären Stress benötigt werden, die für optimale Bedingungen in der Zellkultur nicht benötigt werden.

In verschiedenen Organismen ist nicht jeder Aminosäurerest des Heptapeptids der CTD gleich wichtig. Durch genetische Manipulation konnten wichtige Beiträge zur Funktions-Analyse der repetitiven Struktur der CTD in der Hefe gemacht werden. In *S. pombe* ist der Austausch der Aminosäure Serin-5 oder Tyrosin-1 zu Alanin in der CTD für die Zellen letal (Schwer und Shuman et al., 2011). In *S. cerevisiae* ist dagegen auch Serin-2 für die Zellviabilität wichtig (West und Corden, 1995; Stiller et al., 2000). In beiden Hefestämmen führen rekombinante Polymerasen, die ein Alanin anstatt eines Threonins an Position 4 des CTD-Heptads haben, zu keinem Wachstumsdefekt (Schwer und Shuman et al., 2011). Im Gegensatz zu diesen Studien zeigen die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit, dass die Aminosäure

Threonin-4 der CTD für die Viabilität von Säugetierzellen essenziell ist. Das Threonin-4 der CTD kann weder durch ein Serin noch durch ein Alanin ersetzt werden, ohne gravierende Effekte auf die Zellen zu haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Bedeutung von Serin-2, Serin-5 und Serin-7 für die Viabilität von HEK293-Zellen untersucht. Alle drei Aminosäuren sind essenziell, auch wenn Serin-7-Mutanten im Phänotyp attenuiert waren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Veränderungen der Konsensussequenz eine Bindung von Initiations- oder Elongationsfaktoren erschweren könnten und dadurch das Fortschreiten des Transkriptionszyklus oder die Rekrutierung der Prozessierungsfaktoren für die RNA beeinträchtigen. Den Polymerase-Mutanten fehlen bestimmte modifizierbare Aminosäurereste in der CTD und sie könnten somit schlechtere Substrate für CTD-modifizierende Enzyme darstellen (Chapman et al., 2008). In Eukaryoten lässt sich der Trend erkennen, dass mit der höheren Entwicklung eines Organismus die Abhängigkeit von einzelnen Aminosäureresten in der CTD zunimmt.

4.2 Threonin-4-Phosphorylierung ist eine neue CTD-Modifikation

Jeder Aminosäurerest innerhalb der Heptapeptide kann reversibel modifiziert werden und ermöglicht so zahlreiche Kombinationen und Signaturen, die wie ein Code gelesen werden können, indem die An- bzw. Abwesenheit einer Modifikation die Interaktionen zwischen CTD und anderen Faktoren beeinflusst. Folglich wurde ein Modell entwickelt, indem unterschiedliche Modifikationen innerhalb der CTD-Heptapeptide einen CTD-Code generieren, der die zeitliche Abfolge reguliert, in der verschiedene Proteine rekrutiert werden (Buratowski, 2003).

Die Rolle der CTD in der Genexpression wurde vor allem durch die Etablierung monoklonaler Antikörper aufgeklärt, die zwischen unterschiedlich modifizierten Heptapeptiden unterscheiden (Palancade und Bensaude, 2003). In unserer Arbeitsgruppe wurden monoklonale Antikörper gegen die phosphorylierte Form jeder Aminosäure der CTD-Konsensussequenz ($Y_1S_2PT_4S_5PS_7$) generiert und auf ihre Spezifität getestet (Chapman et al., 2007; Heidemann, 2010). Mit Hilfe dieser Antikörper konnte die Phosphorylierung aller fünf potenziellen Modifikationsstellen der CTD *in vivo* nachgewiesen werden. In Säugetieren wurde bereits eine Phosphorylierung der Threonin-Reste der CTD der Pol-II dargestellt (Zhang und Corden, 1991). Eine Funktion konnte dieser Modifikation damals jedoch noch nicht zugeordnet werden. Da für die Identifikation dieser Phosphorylierung nicht

monoklonale Antikörper verwendet wurden, sondern die CTD *in vivo* markiert wurde konnte bislang auch nicht eindeutig festgestellt werden, ob Threonin an Position 4 tatsächlich phosphoryliert wird, da sich insgesamt 15 Threonin-Reste an den Positionen 2, 5 und 7 der Säugetier-CTD befinden. Mit den beiden Antikörpern 6D7 und 1G7 konnte in dieser Arbeit eindeutig belegt werden, dass wirklich Threonin-4 der CTD phosphoryliert wird und dass diese CTD-Modifikation in der transkribierenden Pol-II₀-Form vorkommt. Durch die Threonin-4-Phosphorylierung wird die Kombinationsmöglichkeit an Phosphorylierungsmuster innerhalb einer CTD nochmals gesteigert. Insgesamt sind jetzt 32 (2^5) verschiedene Phosphorylierungszustände in einer CTD-Wiederholung möglich: unphosphoryliert oder Serin-2-, Serin-5-, Serin-7-, Tyrosin-1- und Threonin-4-phosphoryliert in allen möglichen Kombinationen. Massenspektrometrische Untersuchungen der distalen CTD-Wiederholungen 36-49 geben erste Hinweise, dass faktisch jedes Serin, Tyrosin und Threonin innerhalb der CTD durch Kinasen phosphoryliert werden kann (Mayya et al., 2009). Wenn man davon ausgeht, dass pro Zelle nur ca. 100.000 Pol-II-Moleküle vorhanden sind, besteht theoretisch die Möglichkeit, dass jede Pol-II in einer Zelle in Bezug auf ihr CTD-Modifikationsmuster einzigartig ist. Die durchgeführten Ko-Immunpräzipitationen können heterogen-modifizierte Pol-II-Populationen in Zellen bestätigen. Alle CTD-phosphorylierungsspezifischen Antikörper präzipitieren Polymerasen, die im Westernblot jeweils auch Reaktivität für andere CTD-Phosphoantikörper zeigen. Dies kann nur bedeuten, dass die Mehrheit der einzelnen CTD-Heptapeptide der präzipitierten Pol-II in ihrem CTD-Modifikationsmuster unterschiedlich ist. Diese Vielfalt an unterschiedlich phosphorylierten Heptapeptiden innerhalb der CTD lässt auf eine wesentlich komplexere Regulation der Genexpression als bisher vermutet schließen.

4.3 Plk3 ist eine CTD-Threonin-4-Kinase

Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) wurden sehr lange als Hauptakteure in der Regulation des Zellzyklus gesehen. Cdks benötigen einen zusätzlichen Kofaktor, das Cyclin, um ihre Aktivität entfalten zu können. Die Konzentration der jeweiligen Cycline ist eng an den Zellzyklus gekoppelt und je nachdem, ob oder mit welchem Cyclin die Cdks assoziieren, kann die Substratspezifität und Aktivität der Cdks reguliert werden. Neben den Cdks gibt es jedoch weitere Proteinkinasen, die das Fortschreiten des Zellzyklus regulieren. Polo-ähnliche Kinasen (Plks) sind potenzielle

Ser/Thr-Kinasen, die eine essenzielle Rolle sowohl während des Zellzyklus als auch bei der Regulation von Signalwegen, ausgelöst durch verschiedene Stresse, erfüllen (Winkles und Alberts, 2005). Plks sind evolutionär hoch konserviert und sowohl in *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, Hefe, *Xenopus laevis* als auch in Maus und Mensch beschrieben (Xie et al., 2001). In Säugetieren gibt es mindestens vier Plks (Plk1-4), die verschiedene Expressionsprofile aufweisen und unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen (Winkles und Alberts, 2005).

Der Aufbau der Plks ist relativ ähnlich. Alle Plks besitzen in der C-terminalen Region eine oder zwei Polo-Boxen und im N-terminalen Bereich eine Ser/Thr-Kinase Domäne, die sehr stark innerhalb der Plks konserviert ist. Die Polo-Box Domäne (PBD) fungiert als Phosphoserin/Phosphothreonin-Bindedomäne. PBD inhibiert die basale Aktivität der Kinase-Domäne wenn kein Ligand gebunden ist. Erst die phosphorylierungsabhängige Bindung von PBD an sein Substrat führt zur Freisetzung der Kinase-Domäne und zur Aktivierung der Kinase (Lowery et al., 2005).

Während des Zellzyklus scheint Plk3 ziemlich konstant exprimiert zu sein, wobei die Kinaseaktivität während der späten S und der G2-Phase am höchsten ist (Xie et al., 2001). Plk3 kann durch verschiedene Stresse aktiviert und die enzymatische Aktivität durch Autophosphorylierung und nuklearen Import zusätzlich verstärkt werden (Alberts und Winkles, 2004). Plk3 kann die Phosphatase Cdc25c an Serin 191 phosphorylieren, wodurch die Aktivität von Cdc25c inhibiert wird (Xie et al., 2001; Bahassi et al., 2004). Für den Eintritt in die Mitose ist die Aktivität von Cdc25c jedoch essenziell, da diese Phosphatase den Kinase-Komplex Cdc2/CyclinB, der den Übergang von der G2- in die M-Phase katalysiert, dephosphoryliert und aktiviert (Bahassi et al., 2004). Plk3 wird durch DNA-Schäden ATM-abhängig aktiviert und reguliert die stressinduzierten Signalwege durch Phosphorylierung von Proteinen wie zum Beispiel p53 (Xie et al., 2001; Bahassi et al., 2006). Plk3 wird auch durch oxidativen Stress aktiviert und fungiert als negativer Regulator von HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor-1 α*) (Wang et al., 2008; Yang et al., 2008).

HIF ist ein sequenzspezifisch DNA bindendes Protein, das Gene für die Aufrechterhaltung der Homöostase reguliert. Unter normalen Sauerstoffbedingungen ist die Untereinheit HIF-1 α an spezifischen Prolyl-Resten hydroxyliert und wird durch den Hippel-Lindau-Tumorsuppressor abgebaut. Hypoxie führt zur Inhibierung der Prolyl-Hydroxylase und dadurch zur Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α .

Krebszellen generieren durch ihre starke Proliferation und einer daraus resultierenden unzureichenden Blutversorgung häufig ein sauerstoffarmes Milieu, wodurch HIF aktiviert wird. Dieser Transkriptionsfaktor initiiert verschiedene Prozesse, die das Tumorstadium und die Verbreitung von Metastasen verstärken (Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2009). Durch die Generierung einer Plk3 Knockout-Maus konnte die Arbeitsgruppe von Wei Dai einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Rolle von Plk3 in der Zellproliferation und Onkogenese leisten. Plk3 Knockout-Mäuse generieren Tumore in verschiedenen Organen und zeigen eine Gewichtszunahme. Plk3 kann unter Stress-Bedingungen HIF-1 α durch Phosphorylierung destabilisieren und somit inhibieren. Plk3 fungiert so als Tumorsuppressor und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Signalwegen, die durch Hypoxie induziert werden (Yang et al., 2008). Die Inaktivierung von Plk3 kann sowohl durch den Export ins Cytoplasma als auch durch Abbau im Zellkern über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg erfolgen (Alberts und Winkles, 2004).

Im Rahmen meiner Arbeit konnte Plk3 als CTD-Threonin-4-Kinase identifiziert werden. Die Erkenntnisse bezüglich der Threonin-4-Kinase, die in dieser Arbeit sowohl in Säugetierzellen als auch *in vitro* mit aufgereinigten Säugetierkinasen gewonnen wurden, identifizieren Plk3 als Threonin-4-Kinase. Plk-Kinasen werden über ihre C-terminale Polo-Box-Domäne (PBD) an ihr Substrat rekrutiert. Das Erkennungsmotiv für PBD ist ein phosphoryliertes Serin oder Threonin mit einem vorausgehenden Serin und einem nachfolgenden Prolin (S-S^P/T^P-P) (Elia et al., 2003; Lowery et al., 2005). Im distalen Bereich der CTD sind vier Heptapeptide mit dieser optimalen Erkennungssequenz vorhanden. Die CTD könnte somit eine Plattform für die Bindung von Plk3 darstellen. Das Erkennungsmotiv von PBD muss ein phosphoryliertes Serin enthalten. Folglich könnte eine Serin-5-Phosphorylierung der CTD eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung der Kinase sein. Da Cdk7 erst zu Beginn der Transkription die Pol-II an den Serin-5-Resten der CTD phosphoryliert, könnte dies eine Erklärung für das Fehlen einer Threonin-4-Phosphorylierung in der Promotorregion von Genen in den ChIP-Seq-Experimenten sein. Zur Bestätigung dieser Hypothese wird zur Zeit ein monoklonaler Antikörper gegen Plk3 in unserem Labor generiert, mit dem in zukünftigen Studien die genomweite Lokalisation von Plk3 in Korrelation zur Verteilung der Threonin-4-Phosphorylierung analysiert werden soll.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die Aminosäure Threonin-4 der CTD für die Viabilität von Säugetierzellen essenziell ist. Der genetische Knockout von Plk3 in Mäusen ist nicht letal, führt aber im fortgeschrittenen Alter der Tiere zur Generierung von Tumoren in verschiedenen Organen (Yang et al., 2008). Der siRNA-vermittelte Knockdown von Plk3 in dieser Arbeit führte nicht zu einer kompletten Verringerung des Threonin-4-Phosphorylierungslevels der CTD. Möglicherweise gibt es in Säugetieren eine weitere Kinase (oder Kinasen) für die CTD-Threonin-4-Phosphorylierung. Ein potenzieller Kandidat ist die Kinase Plk1, die in unseren Experimenten im Vergleich zu Plk3 eine um das ca. 10-fache verringerte Threonin-4-Kinaseaktivität zeigte. Ein Doppel-Knockdown von Plk3 und Plk1 ist jedoch letal für Säugetierzellen, weshalb keine Aussage über eine vollständige Verringerung der Threonin-4-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen möglich ist (Daten nicht gezeigt). Die Substitution von Threonin zu Leucin (neutrale Aminosäure) an Position 4 eines synthetischen Hepta-CTD-Peptids führte *in vitro* zu keiner Verringerung der DNA-Pk Kinaseaktivität (Trigon et al., 1998). DNA-Pk konnte auch in dieser Arbeit als CTD-Threonin-4-Kinase *in vitro* ausgeschlossen werden. Die Hemmung der Kinase Cdk9 durch die Inhibitoren DRB (*5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol*) und Flavopiridol führte in Gesamtzell-Extrakten von Säugetierzellen zu einer Abnahme des Serin-2- und Threonin-4-Phosphorylierungslevels der CTD (Heidemann, 2010). Unsere *in vitro* Kinaseassay Daten zeigen jedoch eindeutig, dass Cdk9 die CTD spezifisch an Serin-2, jedoch nicht an Threonin-4 phosphorylieren kann. Somit kann neben DNA-Pk auch Cdk9 zumindest *in vitro* als CTD-Threonin-4-Kinase ausgeschlossen werden.

4.4 Auswirkungen von oxidativem Stress

Veränderungen der Umwelt bedingen zellulären Stress. Sie erfordern eine Anpassung der Zelle und führen zur Aktivierung von Signalketten, die die Expression spezifischer, stressinduzierter Gene regulieren. Oxidativer Stress und UV-Bestrahlung rufen DNA-Schäden hervor und führen in der Zelle zur Expression von stressinduzierten Genen. Es kommt aber auch zur Ubiquitylierung der größten Untereinheit Rpb1 der Pol-II sowie deren Abbau durch das Proteasom (Ratner et al., 1998; Inukai et al., 2004). Reaktionen auf zellulären Stress spiegeln sich auch in dem

CTD-Modifikationsmuster der Pol-II wieder, die vor ihrem Abbau hyperphosphoryliert wird (Bregman et al., 1996; Ratner et al., 1998).

Die Aktivierung verschiedener Kinasen nach DNA-Schäden könnte eine Erklärung für die starke Phosphorylierung der CTD sein. Cdk9 kann durch UV aktiviert werden (Nguyen et al., 2001) und scheint die CTD dann sowohl an Serin-2 als auch Serin-5 phosphorylieren zu können.

ROS (*Reactive oxygen species*) sind in der Zelle allgegenwärtig und verursachen Schäden an biologischen Molekülen einschließlich der DNA. Oxidativer Stress führt vor allem zu Basenmodifikationen in der DNA, wodurch hoch mutagene Fehlpaarungen entstehen die durch Basenexzisionsreparatur in der Zelle korrigiert werden können. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass oxidativer Stress auch zu einer Hyperphosphorylierung der CTD führt. Im Gegensatz zur UV-induzierten Hyperphosphorylierung der CTD an Serin-2 und Serin-5 konnte unter oxidativen Bedingungen ausschließlich eine Zunahme der CTD-Threonin-4-Phosphorylierung beobachtet werden. Oxidativer Stress und UV-Bestrahlung führen zu verschiedenen DNA-Schäden und zur Expression unterschiedlicher stress-induzierter Gene (Inukai et al., 2004). Die Aktivierung von Cdk9 könnte folglich für die Regulation von UV-induzierten Genen, aber nicht für die Regulation von oxidativ-induzierten Genen wichtig sein. Plk3 wird unter oxidativem Stress aktiviert (Wang et al., 2008) und konnte in dieser Arbeit als Threonin-4-spezifische CTD-Kinase identifiziert werden. Die Zunahme der Threonin-4-Phosphorylierung während oxidativem Stress erfolgte parallel zur Erhöhung der Plk3-Proteinmenge. Diese Daten bestätigen, dass Plk3 unter oxidativen Bedingungen aktiviert wird und Threonin-4 stressabhängig phosphoryliert. Das CTD-Modifikationsmuster scheint somit abhängig von dem jeweiligen zellulären Stress und der dadurch rekrutierten Kinasen zu variieren. Anhand von ChIP-Seq-Analysen der Thr4/Ala-Mutante konnte nachgewiesen werden, dass die Threonin-4-Phosphorylierung der CTD nicht nur aktivierend sondern auf bestimmte Gene (z.B. ATF3) auch reprimierend wirken könnte. So wäre es durchaus möglich, dass über bestimmte Modifikations-Signaturen innerhalb der CTD eine spezifische Genexpression zur Stressantwort gesteuert wird.

DNA-Läsionen führen häufig zu einem Arrest der elongierenden Pol-II und deren Abbau könnte nötig sein, um die Reparaturstelle zugänglich zu machen (Ratner et al., 1998). Serin-5-Phosphorylierung der CTD wird als eine Voraussetzung für die

Ubiquitynylierung von Rpb1 und der damit einhergehenden Degradation der Pol-II beschrieben (Mikhaylova et al., 2008). Denkbar ist, dass die durch Plk3 erhöhte Threonin-4-Phosphorylierung allein oder in Kombination mit phosphoryliertem Serin-5 auch den Abbau der durch DNA-Schäden arretierten Pol-II fördert.

4.5 Rolle der CTD-Threonin-4-Phosphorylierung im Transkriptionszyklus

Nach Identifikation von Threonin-4 als weitere CTD-Phosphorylierung und von Plk3 als Threonin-4-spezifische CTD-Kinase stellte sich die Frage, wann Pol-II diese Phosphorylierung während der Transkription trägt und ob diese Modifikationsstelle einen ähnlichen Einfluss auf die Regulation der Transkription hat wie die benachbarten Aminosäurereste Serin-2 und Serin-5.

4.5.1. mRNA 3'-Prozessierung

Genomweite Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit belegen, dass CTD-Modifikationen in unterschiedlichen Gen-Bereichen verschieden stark auftreten. Die Verteilung der Pol-II abhängig von der Phosphorylierung scheint mit bestimmten Transkriptions-Phasen zu korrelieren. Die für die Transkriptions-Initiation essenzielle Serin-5-Phosphorylierung tritt vor allem an der TSS der Gene auf. Die für die Elongation wichtige Serin-2-Phosphorylierung wird dagegen erst innerhalb der Gene generiert und akkumuliert am 3'-Ende. Threonin-4-phosphorylierte Pol-II scheint der Verteilung von Phosphoserin-2 zu folgen und befindet sich vor allem in der 3'-Region aktiver Gene. Die Threonin-4-Phosphorylierung akkumuliert im Gegensatz zur Serin-2-Phosphorylierung jedoch erst einige hundert Nukleotide hinter der Poly-A-Stelle. Dies könnte bedeuten, dass bei einigen Genen eine Serin-2-Phosphorylierung einer Threonin-4-Phosphorylierung der CTD vorausgeht und eine Voraussetzung für die Rekrutierung einer Threonin-4-spezifischen Kinase ist. Die starke Anreicherung der Threonin-4-Phosphorylierung im 3'-Bereich der Gene lässt auf eine mögliche Funktion dieser CTD-Modifikation in der 3'-Prozessierung oder der Termination der Transkription schließen. Einige RNA-Prozessierungsfaktoren erkennen die CTD mit Hilfe der CTD-Interaktionsdomäne (CID). Zu diesen Faktoren gehören Mce (*mammalian capping enzyme*), das in Säugetieren die 5'-Cap-Struktur der prä-mRNA bildet (Gosh et al., 2010), sowie Pcf11. Pcf11 ist eine essenzielle Untereinheit eines

Prozessierungsfaktors in Hefe und Menschen, die in der 3'-Prozessierung und in der Termination der Transkription eine Rolle spielt (Barilla et al., 2001; West und Proudfoot, 2007). Die Bindung der CID-Domäne an CTD wurde durch kristallographische Untersuchungen aufgeklärt. Ein synthetisches, an Serin-2-phosphoryliertes CTD-Peptid wurde zusammen mit Pcf11 kristallisiert und durch Röntgenstrukturanalyse untersucht (Meinhart und Cramer, 2004). Die Bindung zwischen dem CTD-Peptid und der CID von Pcf11 erfolgt über eine Furche, die konserviert zu sein scheint und somit auch für andere CID-Domänen als Interaktionsplattform fungieren könnte. Das CTD-Peptid zeigte eine β -Krümmung als zentrales Motiv (S_2^P - P_3 - T_4 - S_5), wohingegen die flankierenden Aminosäurereste in gestreckter Konformation vorlagen. Die Seitenketten von Tyrosin-1 und Prolin-3 sind in die hydrophobe Furche der CID eingebettet, wobei Tyrosin-1 der CTD eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Asparaginsäurerest der CID ausbildet. Dies könnte den letalen Effekt der Substitution von Tyrosin-1 durch Phenylalanin in Hefe erklären (West und Corden, 1995), da diese Mutation zu einem Verlust der CTD-CID-Bindung führt (Meinhart und Cramer, 2004). Die Phosphatgruppe eines phosphorylierten Serin-2 der CTD kontaktiert nicht direkt die Oberfläche der CID, dennoch verstärkt eine Serin-2-Phosphorylierung die Bindung zwischen CTD und CID. Die indirekte Erkennung der Serin-2-phosphorylierten CTD könnte aus einer Stabilisierung der CTD- β -Krümmung durch eine zusätzliche intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Phosphatgruppe von Serin-2 und der Hydroxyl-Seitenkette von Threonin-4 resultieren (Meinhart und Cramer, 2004). Eine CTD-Threonin-4-Phosphorylierung könnte somit inhibitorisch für die Bindung einiger CTD-Bindeprotein sein, da diese Modifikation eine Wasserstoffbrückenbindung verhindert, wodurch die Interaktion zwischen CTD und CID destabilisiert werden könnte. Folglich könnte die CTD-Threonin-4-Phosphorylierung die mRNA-Prozessierung zumindest indirekt beeinflussen. Biochemische Studien zur Ssu72 Phosphatase-Aktivität auf genetisch manipulierten CTD-Tetrapeptiden ergaben, dass die Substitution von Tyrosin-1, Threonin-4 oder Prolin-6 die Aktivität des Enzyms stark reduziert, wohingegen Substitutionen toleriert werden, wenn diese das Prolin-3 oder Serin-2 betreffen (Hausmann et al., 2005). Die Aminosäure Threonin-4 scheint somit eine wichtige Rolle für die Ssu72 CTD-Serin-5-Phosphatase-Aktivität zu spielen.

Die Kristallstruktur des Ssu72/CTD-Komplexes verdeutlicht, dass Ssu72 nur an CTD binden kann, wenn ein phosphoryliertes Serin in Kombination mit einem Prolin in der *cis*-Konformation vorliegt. Des Weiteren ergaben diese Studien, dass bei der Ssu72/CTD-Interaktion die Seitenkette von Threonin-4 der CTD in eine hydrophobe Spalte der CID eingebettet ist. Dabei bildet das CTD-Threonin-4 eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zu Prolin-6 aus, wodurch das Prolin-6 in die *cis*-Konformation isomerisiert. Diese Isomerisierung wird durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Prolin-6 und Seitenketten von Ssu72 stabilisiert. Threonin-4, phosphoryliertes Serin-5 und Prolin-6 des gleichen Heptads interagieren mit Ssu72 (Xiang et al., 2010; Werner-Allen et al., 2011). Folglich könnte eine Threonin-4-Phosphorylierung allein oder in Kombination mit anderen CTD-Modifikationen die Bindung spezifischer Faktoren, wie zum Beispiel Ssu72 in Säugetierzellen, das nach der 3'-Prozessierung der mRNA entfernt wird, an die CTD regulieren.

Der Vergleich der CTD-CID-Struktur mit Strukturen anderer Protein-CTD-Peptid-Interaktionen zeigt jedoch deutlich, dass es große Unterschiede in der Art und Weise der CTD-Erkennung gibt (Verdecia et al., 2000; Xiang et al., 2010; Gosh et al., 2011). Die Interaktion der CTD mit verschiedenen Partnern scheint eine unterschiedlich modifizierte CTD zu erfordern. Durch die Threonin-4-Phosphorylierung wird zum einen die Variabilität des CTD-Phosphorylierungsmusters weiter erhöht und zum anderen die Regulation verschiedenster Prozesse präzisiert.

4.5.2. Elongation der Transkription

CTD-Threonin-4 könnte während der Transkription aber nicht nur für 3'-Prozessierungsvorgänge der mRNA wichtig sein. ChIP-Seq-Analysen von Raji-Zellen mit konditional exprimierten Polymerase-Mutanten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass Threonin-4 schon während der Elongation der Transkription eine wichtige Rolle spielt. Polymerasen mit Austausch von Threonin-4 zu Alanin scheinen in Raji-Zellen die Transkription von Genen noch normal zu initiieren, da die für die Initiation wichtige Serin-5-Phosphorylierung an der TSS der Gene unverändert stattfindet. Während der Elongation scheinen diese Polymerasen jedoch Probleme zu haben und akkumulieren 150-300bp unterhalb der TSS. Diese Anreicherung der Polymerasen ist mit erhöhten Serin-2- und Serin-5-Phosphorylierungssignalen assoziiert. Durch einen möglichen Defekt während der Elongation scheint die Pol-II an einem bestimmten Bereich der Gene aufzulaufen, wodurch mit Serin-2-

Phosphorylierung auch Modifikationen eingeführt werden, die unter normalen Bedingungen nicht stattfinden und so zur Generierung eines zweiten Pol-II-Peaks unterhalb der TSS führen. Die Untersuchungen zeigen weiter, dass Serin-2-Phosphorylierungssignale im 3'-Bereich der Gene nicht mehr auftreten. Auch diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Elongation blockiert wird, wenn Threonin-4 zu Alanin mutiert ist.

Die Serin-5-Phosphorylierung der CTD führt zur Rekrutierung der Capping-Enzyme (McCracken et al., 1997) und nach Synthese von 20-30 Nukleotiden liegt das naszierende Transkript bereits vollständig „gecap“ vor (Nechaev und Adelman, 2011). Da rekombinante Pol-II ohne Threonin-4 frühestens nach Synthese von 150 Nukleotiden blockiert zu sein scheint und zusätzlich die Verteilung der Serin-5 phosphorylierten Pol-II nicht beeinflusst ist, sollten die naszierenden Transkripte am 5'-Ende noch erfolgreich prozessiert werden können. Im Promotorbereich bindet DSIF mit den Untereinheiten Spt4/5 an die Pol-II (Wada et al., 1998) und rekrutiert den negativen Elongationsfaktor NELF, was zu einem Transkriptionsarrest führt (Yamaguchi et al., 1999). Die Depletion von NELF führt in *Drosophila* zu einer Reduktion des Pol-II-Niveaus an den meisten Promotoren (Nechaev und Adelman, 2011). In Raji-Zellen konnte durch die Expression von Thr4/Ala-Polymerasen keine Abnahme der Pol-II-Menge an den Promotoren beobachtet werden. Folglich könnte die Rekrutierung und Bindung von NELF an die Pol-II noch erfolgen. Der Übergang von der frühen Elongationsphase in die produktive Elongation erfolgt durch P-TEFb, einem Heterodimer, zusammengesetzt aus der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk9 mit dem CyclinT. Cdk9 phosphoryliert sowohl die CTD an Serin-2, als auch NELF und die Spt5-Untereinheit von DSIF (Yamada et al., 2006). Der Übergang in die produktive Elongation könnte aus mehreren Gründen den kritischen Schritt für die Thr4/Ala-Polymerase hin zum Elongationsdefekt darstellen. Zum einen könnte die Aminosäure Threonin-4 unmodifiziert oder modifiziert eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung von P-TEFb sein. Zum anderen könnte Threonin-4 aber auch für die Bindung von Cdk9 an die CTD wichtig sein. Falls Cdk9 durch das Fehlen von Threonin-4 nicht rekrutiert werden kann, könnten Spt5 und NELF nicht phosphoryliert werden, wodurch die Hemmung der Transkription und folglich die Blockade der Pol-II nicht beendet werden kann. Cdk12 wurde kürzlich als weitere potenzielle Serin-2-spezifische CTD-Kinase in Säugetieren beschrieben (Bartkowiak et al., 2010). Folglich scheint eine zweite Kinase an der Regulation des Serin-2-Phospho-

rylierungsstatus der CTD während des Transkriptionszyklus beteiligt zu sein. Threonin-4 könnte für bestimmte Kinasen eine Voraussetzung sein, um die CTD der Pol-II zu phosphorylieren. Obwohl die Daten dieser Arbeit das gehäufte Auftreten einer Threonin-4-phosphorylierten Pol-II erst im 3'-Bereich der Gene belegen, könnte diese Modifikation bereits in Promotornahen-Regionen oder innerhalb der Gene auftreten, da die Antikörperbindung von 6D7 (α Thr4-P) durch eine benachbarte Serin-5- oder Serin-2-Phosphorylierung der CTD gehemmt wird.

Eine wichtige Voraussetzung für die Transkription von Genen ist ein freier Zugang der Pol-II zum DNA-Template. Nukleosomen stellen nicht nur für die Initiation der Transkription ein Hindernis dar, sondern auch während der Elongation müssen Histone ständig von der Pol-II überwunden werden. Für Elongation durch das Chromatin müssen Chromatin-Remodelling-Komplexe rekrutiert und die Histone unter anderem an H2B monoubiquitinyliert (H2Bub1) werden (Pavri et al., 2006). H2Bub1 stimuliert die Aktivität des Heterodimers FACT (*facilitates chromatin transcription*), der das H2A/H2B-Dimer aus den Nukleosomen vor der Pol-II entfernt, wodurch die Nukleosomen von der DNA möglicherweise dissoziieren und damit der Pol-II den Weg durch das Chromatin erleichtert (Reinberg und Sims, 2006). Chromatin könnte ein kritische Barriere für die Thr4/Ala-Mutante darstellen. Die Aminosäure Threonin-4 könnte unmodifiziert oder modifiziert eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung von Chromatin-Remodelling-Komplexen oder Histon-modifizierenden Faktoren sein. Falls bestimmte Chromatin-modifizierende Faktoren durch das Fehlen von Threonin-4 nicht mehr rekrutiert werden können, könnte daraus eine erhöhte Nukleosomendichte auf dem DNA-Template resultieren, durch die die Pol-II an der weiteren Transkription gehindert wird. Dies könnte eine weitere Erklärung für die Verringerung der Pol-II-Menge innerhalb der Gene und im 3'-Bereich von Genen nach Expression der Thr4/Ala-Mutante in Raji-Zellen sein.

Da die hoch konservierte Aminosäure Threonin-4 in der Hefe-CTD nicht für das Wachstum essenziell ist, scheint Threonin-4 in höheren Eukaryoten eine funktionelle Erweiterung durchlaufen zu haben. In der Hefe hat Cdk9 zwei potenzielle Homologe Ctk1 und Bur1/Bur2, die beide für eine effiziente Transkriptions-Elongation wichtig sind (Qiu et al., 2009). Trotz der vielen funktionellen Gemeinsamkeiten zwischen P-TEFb in Säugetieren und Ctk1/Bur1/Bur2 in der Hefe gibt es dennoch auch funktionelle Unterschiede. Cdk9 reguliert z.B. sowohl H3K36me3 als auch H3K4me3 und H2Bub1, wohingegen in der Hefe diese Aufgaben auf Ctk1 (H3K36me3) und

Bur1 (H3K4me3 und H2Bub1) aufgeteilt sind (Wood und Shilatifard, 2006; Pirngruber et al., 2009). Es könnte also durchaus möglich sein, dass Threonin-4 für die Bindung von Cdk9 in Säugern, aber nicht für die von Ctk1 und/oder Bur1/Bur2 an die CTD der Pol-II in der Hefe eine wichtige Rolle spielt. Die funktionelle Erweiterung von Threonin-4 in höheren Eukaryoten könnte sich auch in Regulationswegen für die Elongation, 3'-Prozessierung oder die Rekrutierung von Chromatin-Remodelling-Komplexen widerspiegeln. In der Hefe ist NELF nicht konserviert und Promotorproximales Pausieren der Pol-II konnte nicht beobachtet werden (Narita et al., 2003; Aida et al., 2006). Folglich scheint dies eine Variante der Genregulation zu sein, die so nur in höheren Eukaryoten stattfindet. Die Ubiquitylierung von H2B wird in der Hefe durch Rad6/Bre1 und in Säugetieren durch den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex RNF20/40 katalysiert (Xiao et al., 2005; Pirngruber et al., 2009). Denkbar wäre also, dass in Hefe und Säugetieren die Rekrutierung der Chromatin-modifizierenden Faktoren abhängig von verschiedenen Aminosäuren der CTD erfolgt.

CTD von Säugetieren kann nicht nur durch Phosphorylierung sondern auch durch Glykosylierung der Serin- und Threonin-Reste modifiziert werden (Kelly et al., 1993). Ob der Elongationsdefekt in Raji-Zellen durch das Fehlen der Aminosäure Threonin-4 oder durch das Fehlen der Phosphorylierung oder Glykosylierung an Threonin-4 hervorgerufen wird, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

4.6 Lokalisation der RNA-Polymerase II in der Zelle

Die Pol-II lokalisiert in allen Bereichen des Nukleoplasma vorwiegend aber an aktivem Chromatin (Bregman et al., 1995; Zeng et al., 1997). Alle phosphorylierungsspezifischen Antikörper der CTD zeigten eine großflächige Färbung des Nukleus, wobei einige Stellen bevorzugt angefärbt wurden, jedoch nicht die Nukleoli. Diese Verteilung der Pol-II spricht für eine über das gesamte Nukleoplasma verteilt stattfindende Transkription.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit den phosphorylierungsspezifischen CTD-Antikörpern eine unterschiedliche Verteilung der Pol-II in der Zelle abhängig vom CTD-Phosphorylierungsmuster gezeigt werden. Die Verteilung der Pol-II und ihrer Phosphorylierungen im Zellkern ist sehr heterogen. Antikörper gegen Serin-5- und Serin-7-phosphorylierte Pol-II akkumulieren an einzelnen Stellen in Interphase-Zellen wohingegen Antikörper gegen Serin-2- und Threonin-4-phosphorylierte Pol-II das Nukleoplasma somatischer Kerne mehr gleichmäßig anfärben. Phosphorylierte Pol-II

steht wahrscheinlich für Bereiche mit aktiv transkribierten Genen. Während der Mitose zeigten alle Serin-phosphorylierungsspezifischen Antikörper ein relativ ähnliches Bild. Die Pol-II befand sich abgelöst vom Chromatin im Zellplasma. Der Grund dafür ist die Entfernung der Transkriptionskomplexe vom Chromatin zu Beginn der Mitose (Parsons und Spencer, 1997). Die Freisetzung der Pol-II vom Chromatin führte jedoch nicht zu einem Verschwinden der Serin-spezifischen-Phosphorylierungen der CTD, obwohl der Eintritt in die Mitose zu einem sofortigen Stillstand der Transkription führt (Christova und Oelgeschläger, 2002). Hyperphosphorylierung der CTD muss daher nicht gleichbedeutend sein mit aktiv transkribierender Pol-II. In transkriptionsinaktiven Zellen konnte eine Pol-II Lokalisation in Speckles zusammen mit prä-mRNA-Spleißingfaktoren nachgewiesen werden (Zeng et al., 1997; Spector und Lamond, 2011). Diese Pol-II ist hyperphosphoryliert und wird von den Antikörpern H5 (α Ser2-P) und H14 (α Ser5-P) erkannt (Bregman et al., 1995). Auch während der Mitose konnte eine Pin1-abhängig hyperphosphorylierte Pol-II beschrieben werden, die transkriptionsinaktiv ist (Xu et al., 2003). Die Hyperphosphorylierung der CTD könnte in Zusammenhang mit der Entfernung von Pol-II-Molekülen vom Chromatin stehen und somit die Chromatin-Kondensation unterstützen (Xu und Manley, 2004). Da an der Bildung von Prä-Initiationskomplexen nur die nicht-phosphorylierte Pol-IIA-Form beteiligt ist, könnte durch die Hyperphosphorylierung der CTD die Reprimierung der Transkription von Genen während der Mitose sichergestellt werden.

Threonin-4-phosphorylierte Pol-II konnte im Rahmen dieser Arbeit überraschenderweise während der Mitose an den Centrosomen und dem Midbody assoziiert beobachtet werden. Welche Rolle spielt diese Phosphorylierung während des Zellzyklus und welche Kinase ist für die Etablierung dieser Phosphorylierung während der Mitose verantwortlich? Im folgenden Kapitel wird näher darauf eingegangen.

4.7 Threonin-4-Phosphorylierung der CTD während der Mitose

Der Phosphorylierungsstatus der CTD spielt eine wichtige Rolle während des Transkriptionszyklus und scheinbar auch während des Zellzyklus (Xu und Manley, 2004). Die Identifikation einer centrosomenspezifischen Assoziation der Threonin-4-phosphorylierten Pol-II *in vivo* war dennoch sehr unerwartet. Die Immunfluoreszenz-Analysen der Phosphoserin-spezifischen CTD-Antikörper ließen zunächst auf eine

gleichmäßige Verteilung der Pol-II im Zellplasma unabhängig von der CTD-Phosphorylierung während der Mitose schließen. Die Threonin-4-Phosphorylierung der Pol-II konnte anhand der unterschiedlichen subklassenspezifischen Phosphothreonin-4-Antikörper 6D7 und 1G7 nachgewiesen werden. Die Assoziation an den Centrosomen konnte des Weiteren durch die Pol-II-spezifischen Antikörper Pol3.3 und 8WG16 bestätigt werden. Nach der Identifikation dieser neuen Threonin-4-phosphorylierten Pol-II-Population stellte sich die Frage, wann die Threonin-4-phosphorylierte Pol-II während des Zellzyklus an die Centrosomen lokalisiert und ob eine spezifische Kinase für diese Phosphorylierung zuständig ist.

Der Zellzyklus umfasst die Interphase bestehend aus der G1-, S- und G2-Phase, sowie die M-Phase, die sich in die Mitose und Zytokinese unterteilt. Die Mitose kann weiter in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert werden. Die Aufgabe der S-Phase ist die Replikation der chromosomalen DNA und die Verdopplung des Centrosoms, wohingegen die Mitose der Weitergabe eines kompletten Chromosomensatzes der zuvor replizierten DNA an die Tochterzelle dient (Nigg, 2007). Centrosomen sind cytoplasmatische Organellen, die aus je zwei Centriolen umgeben von dem pericentriolaren Material mit einer dichten Proteinschicht bestehen. Zu Beginn der Mitose separieren sich die Centrosomen und bilden in den Zellen die beiden Spindelpole (Kishi et al., 2009). Verschiedene Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit deuten daraufhin, dass die centrosomen-spezifische Assoziation der Threonin-4-phosphorylierten Pol-II Zellzyklus-abhängig reguliert wird. Erstens konnte während der Interphase keine Assoziation von Pol-II und Centrosom beobachtet werden. Zweitens lokalisiert Pol-II in jeder Mitosephase zwar immer an Centrosomen, einige Zellen in der Prophase weisen allerdings öfter nur an einem der Centrosomen eine Pol-II Assoziation auf. Dies könnte bedeuten, dass Pol-II erst zu Beginn der Mitose an die Centrosomen rekrutiert und dort spezifisch an Threonin-4 phosphoryliert wird. Drittens führte die Nocodazolbehandlung (chemische Synchronisation) zu einer Anreicherung eines Komplexes, bestehend aus Threonin-4-phosphorylierter Pol-II und der Kinase Plk1. Die Threonin-4-phosphorylierte Pol-II scheint folglich mitosespezifisch an die Centrosomen zu assoziieren und die Kinase Plk1, die durch Phosphorylierung von Proteinen die verschiedenen Phasen der Mitose reguliert (Kishi et al., 2009), könnte auch für die spezifische Modifikation der CTD zuständig sein.

4.7.1. Plk1 eine weitere potenzielle CTD-Threonin-4-Kinase

Plk1 ist eine potenzielle Kinase für Threonin-4 in der Mitose. In der Mitose spielt Plk1 eine zentrale Rolle und reguliert durch Phosphorylierung von Proteinen an den Centrosomen, den Kinetochoren, der mitotischen Spindel und dem Midbody die verschiedenen Phasen der Mitose (Kishi et al., 2009). Plk1 wird durch die Phosphorylierung von AuroraA/Bora an Threonin-210 in der N-terminalen Kinase-Domäne aktiviert und bindet Phosphopeptide mit der C-terminal lokalisierten Polo-Box-Domäne (PBD) (Seki et al., 2008). Für die zelluläre Lokalisation von Plk1 an die Centrosomen ist die PBD und nicht die Kinaseaktivität wichtig (Elia et al., 2003).

In eukaryotischen Zellen ist der Eintritt in die Mitose abhängig von der Phosphorylierung und Aktivierung der Phosphatase Cdc25c. Die Aktivierung der Phosphatase erfolgt nach der Bindung und anschließenden Phosphorylierung durch Plk1 (Elia et al., 2003; Toyoshima-Morimoto et al., 2002). Cdc25c aktiviert ihrerseits den Komplex der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2/CyclinB durch Dephosphorylierung von Cdc2 und reguliert dadurch den Übergang von der G2- zur M-Phase (Qian et al., 2001). Plk1-abhängige Phosphorylierung von Cdc25c während der Prophase führt zu einer nukleären Anreicherung von Cdc25c, wodurch die Aktivität des Cdc2/Cyclin-Komplexes aufrecht erhalten wird (Toyoshima-Morimoto et al., 2002). Während der S- und G2-Phase lokalisiert Plk1 zusätzlich zum Centrosom auch im Cytoplasma und im Zellkern (Taniguchi et al., 2002).

Plk1 bindet dynamisch an unterschiedliche mitotische Strukturen. Während der Interphase und frühen Prophase lokalisiert Plk1 ans Centrosom und ermöglicht die Rekrutierung von γ -Tubulin. Zu Beginn der Mitose wandern die Centrosomen an gegenüberliegenden Stellen auf beiden Seiten des Zellkerns und bilden die beiden Spindelpole. In der späten Prophase und der Prometaphase ist Plk1 an der Separierung der Centrosomen und der Bildung von Mikrotubuli beteiligt. Plk1 kann durch die Kinaseaktivität die eigene Freisetzung vom Centrosom und die Lokalisation an den Kinetochoren, der Spindel-Midzone und dem Midbody fördern. Während der Metaphase bindet ein Teil von Plk1 spezifisch an die Kinetochore und scheint den Übergang von der Metaphase in die Anaphase zu regulieren. In der Anaphase tritt Plk1 konzentriert an der zentralen Spindel-Midzone auf und unterstützt wahrscheinlich die Mikrotubuli-Bewegung zwischen den sich separierenden Chromosomen. In der letzten Phase der Mitose, der Telophase, lokalisiert Plk1 ausschließlich an den Midbody und ist an der Bildung der Teilungsfurche während

der Zytokinese beteiligt (Kishi et al., 2009). Nach Abschluss der Mitose wird Plk1 durch Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg inaktiviert (Winkles und Alberts, 2005).

Plk1 konnte in dieser Arbeit als CTD-Threonin-4-Kinase *in vitro* identifiziert werden. Weitere Erkenntnisse meiner Arbeit deuten daraufhin, dass Plk1 die mitosespezifische Threonin-4-Phosphorylierung der CTD vermittelt. Zum einen konnte anhand von Immunfluoreszenz-Analysen eine Kollokalisierung von Plk1 und Threonin-4-phosphorylierter Pol-II während der Mitose jeweils an Centrosomen und dem Midbody nachgewiesen werden. Zweitens konnte durch chemische Synchronisation von HeLa-Zellen die Existenz eines Komplexes, bestehend aus der Plk1-Kinase und einer Threonin-4-phosphorylierten Pol-II in der Mitose bestätigt werden. Letztlich könnte Plk1 mit der CTD der Pol-II interagieren. Alle Plks binden über die PBD an ihre Erkennungssequenz (S-S^P/T^P-P), welche allein viermal im distalen Bereich der CTD und in zahlreichen Varianten in den restlichen 48 Heptapeptid-Wiederholungen vorkommt.

Für die Bindung von Plk1 ist die Phosphorylierung des Substrats allerdings eine wichtige Voraussetzung. Diese Phosphorylierung kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Einerseits können Prolin-abhängige Kinasen wie z.B. Cdc2 die Proteine phosphorylieren und somit die Bindung von Plk1 ermöglichen (*Nonself-priming*). Andererseits kann Plk1 durch die eigene Kinaseaktivität PBD-Bindestellen an Proteinen generieren (*Self-priming*). Nach Bindung an das phosphorylierte Substrat kann Plk1 entweder das gleiche Protein oder ein drittes Protein, das von dem Plk1-Substrat gebunden wird, phosphorylieren (Park et al., 2010). Interessanterweise konnte die Plk1-Kinase in Immunpräzipitaten für Phosphothreonin-4- nicht aber in Präzipitaten der drei Phosphoserin-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenz-Analysen belegen ebenfalls, dass keine Serin-spezifisch-phosphorylierte Pol-II an den Centrosomen lokalisiert. Falls Plk1 auch *in vivo* eine CTD-Threonin-4-Kinase ist, dann deuten diese Daten daraufhin, dass Plk1 entweder selbst die CTD spezifisch an Threonin-4-phosphoryliert, um binden zu können, oder alternativ über einen anderen Mechanismus rekrutiert wird.

Der siRNA-vermittelte Knockdown von Plk1 hatte einen drastischen Effekt auf die Viabilität von HeLa-Zellen. Ein Grund dafür könnte sein, dass Plk1 mit p53 interagiert und dadurch die Apoptose-induzierende Aktivität von p53 inhibiert (Ando et al.,

2004). Die Hemmung der Plk1-Kinase in nicht-synchronisierten Zellen hatte nahezu keinen Effekt auf den Threonin-4-Phosphorylierungslevel der CTD. In mitotischen Zellen führte der Plk1 Knockdown jedoch zu einem Verlust der Phosphothreonin-4-Antikörper-Reaktivität an den Centrosomen. Ob das Verschwinden der Threonin-4-Phosphorylierungssignale an den Centrosomen direkt durch den Verlust der Kinase oder indirekt durch Aktivierung einer spezifischen Phosphatase verursacht wird, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Nahe liegend aber ist, dass Plk1 direkt für die Threonin-4-Phosphorylierung einer relativ kleinen Subpopulation an Pol-II verantwortlich ist, die während der Mitose mit dem Centrosom assoziiert ist.

4.7.2. Die Rolle der mitosespezifischen Pol-II-Subpopulation

Während des Transkriptionszyklus wird die CTD der Pol-II durch eine Vielzahl an Modifikationen ständig in ihrer Struktur verändert. Die CTD dient offensichtlich als Gerüst für die Interaktion sehr unterschiedlicher Proteine, die den komplexen Prozess der Transkription und der mRNA-Prozessierung steuern. Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass sich auch während des Zellzyklus der CTD-Phosphorylierungsstatus verändert und damit einhergehend die zelluläre Lokalisation. Die spezifisch an Threonin-4-phosphorylierte CTD könnte während der Mitose an den Centrosomen und dem Midbody als Plattform für Proteinen dienen, die den komplexen Prozess der Mitose regulieren. Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Pin1 kann an die CTD binden und den Phosphorylierungsstatus der CTD während der Transkription durch Hemmung der Phosphatase Fcp1 regulieren (Xu und Manley, 2007). Pin1 interagiert während der Mitose mit Plk1 und wird durch Phosphorylierung von Plk1 stabilisiert (Eckerdt et al., 2005). Pin1 könnte ein möglicher Kandidat sein, der während der Mitose über Plk1 mit der Threonin-4-phosphorylierten CTD interagiert und so vielleicht zur Regulation des Zellzyklus beiträgt.

Nach Identifikation von Pol-II an den Centrosomen stellte sich die Frage, wie Pol-II an den Centrosomen gehalten wird und ob das Enzym transkriptionsaktiv ist.

Centrosomen werden im Zellzyklus einmal verdoppelt. Aus dem elterlichen Centriol entstehen semikonservativ zwei neue Centriolen. Centriolen können *de novo* oder aus bereits existierenden Centriolen entstehen. Diese Replikation der Centriolen löste die Suche nach einer centrosomenspezifischen Nukleinsäure aus (Nigg, 2007). Ob DNA in Centriolen und Centrosomen tatsächlich existiert, konnte bis jetzt nicht

übereinstimmend geklärt werden (Alliegro, 2011). In Nocodazol synchronisierten Säugetierzellen konnte anhand von ChIP-Seq-Analysen keine Pol-II Assoziation mit Chromatin während der Mitose nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung schließt aber nicht aus, dass DNA an den Centrosomen existiert.

Dagegen ist die Existenz von RNA an Centrosomen seit einiger Zeit nachgewiesen. Bereits in vier verschiedenen Spezies, Muschel (*Spisula solidissima*), Frosch (*Xenopus*), Schnecke (*Ilyanassa*) und Fliege (*Drosophila*) wurden RNAs an den Centrosomen identifiziert (Alliegro, 2008). In *Drosophila*-Embryonen konnten durch *in situ* Hybridisierungs-Experimente sechs RNAs an den Centrosomen und zehn RNAs an der Spindel-Midzone nachgewiesen werden (Lecuyer et al., 2007).

In Eizellen der Muschel wurden ebenfalls RNAs identifiziert, die spezifisch mit den Centrosomen assoziiert sind. Sequenzanalysen ergaben, dass centrosomen-spezifische RNAs (cnRNA11, cnRNA15 und cnRNA194) für eine Reverse-Transkriptase-Domäne (RVT) kodieren (Alliegro et al., 2006; Alliegro und Alliegro, 2008). Auf Grund der konservierten RVT könnte es in den Centrosomen ein RNA-Genom geben, das mit einer centrosomenassoziierten reversen Transkriptase repliziert wird (Alliegro et al., 2006). Pol-II kann auch RNA transkribieren, da in Zellen, die mit dem Hepatitis delta Virus (HDV) infiziert wurden, nach α -Amanitin-Behandlung nicht nur die allgemeine Transkription, sondern auch die Replikation des RNA-Virusgenoms inhibiert wird (Chang et al., 2008).

In Abwesenheit von DNA kann die Pol-II auch RNA um einige Nukleotide verlängern und scheint somit eine RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität zu besitzen. Auf Grund dieser Aktivität könnte die Pol-II ursprünglich von einer Replikase, die RNA-Genome dupliziert, abstammen und somit das fehlende Glied in der molekularen Evolution darstellen (Lehmann et al., 2007).

Die Fähigkeit der Pol-II, nicht nur DNA, sondern auch RNA zu transkribieren sowie die mögliche Existenz eines RNA-Genoms, stimmen gut mit der Beobachtung einer centrosomenspezifisch assoziierten Pol-II über ein. Welche Funktion diese Pol-II tatsächlich während der Mitose an den Centrosomen erfüllt und ob diese Form der Pol-II wirklich transkriptionsaktiv ist (RNA-Seq-Analyse), muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

4.8 Ausblick

Die Erweiterung der CTD-Modifikationen um die Threonin-4-Phosphorylierung wirft weitere Fragen auf, von denen nur einzelne im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden konnten. Welche Rolle spielt die Threonin-4-Phosphorylierung während der Expression Pol-II transkribierter Gene? Welche Rolle spielen die CTD-Modifikationen während des Zellzyklus? Welche Faktoren binden an welches CTD-Heptapeptid mit welchem Modifikationsmuster? Welche Kombinationen an Modifikationen können in einer Wiederholungseinheit auftreten? Treten unterschiedliche Modifikationsmuster der Heptapeptide im distalen und proximalen Abschnitt der CTD auf? Welche Enzyme sind für diese Modifikationen zuständig und verhindern bestimmte Modifikationen die Interaktionen von Faktoren mit der CTD? Überwiegen bestimmte Modifikationsmuster bei der Expression bestimmter Gene?

Die bisher produzierten monoklonalen Antikörper gegen alle fünf Phosphorylierungsstellen können zur Charakterisierung von Veränderungen des CTD-Phosphorylierungsmusters während der Transkription und des Zellzyklus erheblich beitragen. Phosphoserin-7 und Arginin-Methylierung konnten als CTD-Modifikationen identifiziert werden, die genspezifisch gelesen werden. Dennoch können diese monoklonalen Antikörper keine genaue Information darüber geben, welche und wie viele Modifikationen auf individuellen Heptapeptiden gleichzeitig vorkommen. Die Erkennung der Antikörper wird außerdem durch bestimmte Kombinationen an Modifikationen verhindert.

Zwei unterschiedliche Ansätze in unserer Arbeitsgruppe sollen in der Zukunft diese Probleme beheben und helfen den CTD-Code vollständig verstehen zu können. Die Generierung monoklonaler Antikörper für Signaturen in Heptads oder Heptadpaaren kann einerseits dazu beitragen, Gene zu identifizieren, die für ihre Expression bestimmte Modifikationskombinationen benötigen, und andererseits Informationen darüber liefern, ob bestimmte Kombinationen an Modifikationen die Interaktionen mit Faktoren verhindern. Ein Antikörper gegen eine Serin2-Serin-5-Doppelphosphorylierung innerhalb der CTD konnte bereits generiert werden.

Die massenspektrometrische Analyse von aufgereinigten Pol-II-Molekülen und ihrer CTD stellt den zweiten Ansatz dar. Bisher konnte nur der distale Bereich der CTD massenspektrometrisch untersucht werden, da dieser Abschnitt der CTD zahlreiche Abweichungen von der Konsensussequenz enthält, wodurch die Identifizierung der einzelnen Heptapeptide möglich ist. Der proximale Bereich der CTD besteht

hauptsächlich aus Konsensus-Wiederholungen, weshalb bisher nicht zwischen den einzelnen CTD-Wiederholungen unterschieden werden konnte. In unserer Arbeitsgruppe ist es Roland Schüller gelungen, lebensfähige Zellen mit rekombinanten Polymerasen herzustellen, in denen auch der proximale Teil der CTD massenspektrometrisch untersucht werden kann. In Zusammenarbeit mit Axel Imhof (LMU, Butenandt Institut) ist es nun möglich, neue Erkenntnisse über den CTD-Modifikationsstatus in den einzelnen Heptapeptiden und Hinweise auf ihre Funktion zu erlangen.

5. Literaturverzeichnis

A

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.

Aida, M., Chen, Y., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H. (2006). Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Mol Cell Biol* 26, 6094-104.

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, 387-93.

Albert, A., Lavoie, S. and Vincent, M. (1999). A hyperphosphorylated form of RNA polymerase II is the major interphase antigen of the phosphoprotein antibody MPM-2 and interacts with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J Cell Sci* 112 (Pt 15), 2493-500.

Alberts, G. F. and Winkles, J. A. (2004). Murine FGF-inducible kinase is rapidly degraded via the nuclear ubiquitin-proteasome system when overexpressed in NIH 3T3 cells. *Cell Cycle* 3, 678-84.

Alliegro, M. C. (2008). The implications of centrosomal RNA. *RNA Biol* 5, 198-200.

Alliegro, M. C. (2011). The centrosome and spindle as a ribonucleoprotein complex. *Chromosome Res* 19, 367-76.

Alliegro, M. C. and Alliegro, M. A. (2008). Centrosomal RNA correlates with intron-poor nuclear genes in *Spisula oocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6993-7.

Alliegro, M. C., Alliegro, M. A. and Palazzo, R. E. (2006). Centrosome-associated RNA in surf clam oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9034-8.

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, 321-9.

Ando, K., Ozaki, T., Yamamoto, H., Furuya, K., Hosoda, M., Hayashi, S., Fukuzawa, M. and Nakagawara, A. (2004). Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 25549-61.

B

Bahassi el, M., Hennigan, R. F., Myer, D. L. and Stambrook, P. J. (2004). Cdc25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation. *Oncogene* 23, 2658-63.

Bahassi el, M., Myer, D. L., McKenney, R. J., Hennigan, R. F. & Stambrook, P. J. (2006). Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutat Res* 596, 166-76.

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, 445-50.

Bartkowiak, B., Liu, P., Phatnani, H. P., Fuda, N. J., Cooper, J. J., Price, D. H., Adelman, K., Lis, J. T. and Greenleaf, A. L. (2010). CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev* 24, 2303-16.

Bartolomei, M. S. and Corden, J. L. (1987). Localization of an alpha-amanitin resistance mutation in the gene encoding the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 7, 586-94.

Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-12.

Brahimi-Horn, M. C. and Pouyssegur, J. (2009). HIF at a glance. *J Cell Sci* 122, 1055-7.

Bregman, D. B., Du, L., van der Zee, S. and Warren, S. L. (1995). Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J Cell Biol* 129, 287-98.

Bregman, D. B., Halaban, R., van Gool, A. J., Henning, K. A., Friedberg, E. C. and Warren, S. L. (1996). UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11586-90.

Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nat Struct Biol* 10, 679-80.

Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36, 541-6.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-61.

Bushnell, D. A., Cramer, P. and Kornberg, R. D. (2002). Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1218-22.

Bushnell, D. A., Westover, K. D., Davis, R. E. and Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocystal at 4.5 Å. *Science* 303, 983-8.

C

Chang, J., Nie, X., Chang, H. E., Han, Z. and Taylor, J. (2008). Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *J Virol* 82, 1118-27.

Chapman, R. D. (2002). A functional analysis of the RNA polymerase II large subunit carboxy-terminal domain. Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie, LMU München.

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, 7665-74.

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, 1780-2.

Chapman, R. D., Heidemann, M., Hintermair, C. and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* 24, 289-96.

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, 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, 5355-63.

Christova, R. and Oelgeschlager, T. (2002). Association of human TFIIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat Cell Biol* 4, 79-82.

Corden, J. L., Cadena, D. L., Ahearn, J. M., Jr. and Dahmus, M. E. (1985). A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7934-8.

Cramer, P., Armache, K. J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C. D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J. F.

and Vannini, A. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys* 37, 337-52.

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, 640-9.

Cramer, P., Bushnell, D. A. and Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863-76.

D

Dvir, A., Conaway, J. W. and Conaway, R. C. (2001). Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* 11, 209-14.

E

Ebright, R. H. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* 304, 687-98.

Eckerdt, F., Yuan, J., Saxena, K., Martin, B., Kappel, S., Lindenau, C., Kramer, A., Naumann, S., Daum, S., Fischer, G., Dikic, I., Kaufmann, M. and Strebhardt, K. (2005). Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. *J Biol Chem* 280, 36575-83.

Egloff, S. and Murphy, S. (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24, 280-8.

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, 1777-9.

Elia, A. E., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B. (2003). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299, 1228-31.

Elia, A. E., Rellos, P., Haire, L. F., Chao, J. W., Ivins, F. J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L. C., Smerdon, S. J. and Yaffe, M. B. (2003). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 115, 83-95.

G

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, 660-2.

Ghosh, A., Shuman, S. and Lima, C. D. (2008). The structure of Fcp1, an essential RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* 32, 478-90.

Ghosh, A., Shuman, S. and Lima, C. D. (2011). Structural insights to how mammalian capping enzyme reads the CTD code. *Mol Cell* 43, 299-310.

Glover-Cutter, K., Larochele, 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, 5455-64.

Goldman, S. R., Ebright, R. H. and Nickels, B. E. (2009). Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo. *Science* 324, 927-8.

H

Hampsey, M. and Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113, 429-32.

Hauptenthal, J., Baehr, C., Zeuzem, S. and Piiper, A. (2007). RNase A-like enzymes in serum inhibit the anti-neoplastic activity of siRNA targeting polo-like kinase 1. *Int J Cancer* 121, 206-10.

Hausmann, S., Koiwa, H., Krishnamurthy, S., Hampsey, M. and Shuman, S. (2005). Different strategies for carboxyl-terminal domain (CTD) recognition by serine 5-specific CTD phosphatases. *J Biol Chem* 280, 37681-8.

Heidemann, M. (2010). Die carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II Untersuchung des Modifikationsmusters der carboxy-terminalen Domäne der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II und die Identifikation der CTD-Serin-7-Kinase. SVH Verlag, ISBN: 978-3-8381-2249-6.

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.

Herr, A. J., Jensen, M. B., Dalmay, T. and Baulcombe, D. C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118-20.

Hintermair, C. (2007). Auswirkungen von zellulärem Stress auf den Phosphorylierungsstatus der carboxyterminalen Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie, LMU München.

Hirose, Y. and Manley, J. L. (1998). RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395, 93-6.

Hirose, Y., Tacke, R. and Manley, J. L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 13, 1234-9.

Holzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G. W. and Eick, D. (2005). Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol* 170, 367-78.

I

Inukai, N., Yamaguchi, Y., Kuraoka, I., Yamada, T., Kamijo, S., Kato, J., Tanaka, K. and Handa, H. (2004). A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis. *J Biol Chem* 279, 8190-5.

J

Juven-Gershon, T. and Kadonaga, J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 339, 225-9.

K

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, 10416-24.

Kettenberger, H., Armache, K. J. and Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114, 347-57.

Kim, J. H. and Workman, J. L. (2010). Histone acetylation in heterochromatin assembly. *Genes Dev* 24, 738-40.

Kim, M., Krogan, N. J., Vasiljeva, L., Rando, O. J., Nedeia, E., Greenblatt, J. F. and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517-22.

Kim, T. and Buratowski, S. (2009). Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell* 137, 259-72.

Kishi, K., van Vugt, M. A., Okamoto, K., Hayashi, Y. and Yaffe, M. B. (2009). Functional dynamics of Polo-like kinase 1 at the centrosome. *Mol Cell Biol* 29, 3134-50.

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, 3305-16.

Koch, F., Fenouil, R., Gut, M., Cauchy, P., Albert, T. K., Zacarias-Cabeza, J., Spicuglia, S., de la Chapelle, A. L., Heidemann, M., Hintermair, C., Eick, D., Gut, I., Ferrier, P. and Andrau, J. C. (2011). Transcription initiation platforms and GTF recruitment at tissue-specific enhancers and promoters. *Nat Struct Mol Biol* 18, 956-63.

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, 2484-9.

Kornberg, R. D. (2007). The molecular basis of eucaryotic transcription. *Cell Death Differ* 14, 1989-97.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.

Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E. and Green, M. R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* 370, 477-81.

L

Lecuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P. and Krause, H. M. (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* 131, 174-87.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-60.

Lehmann, E., Brueckner, F. and Cramer, P. (2007). Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity. *Nature* 450, 445-9.

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, 100-5.

Liu, X., Bushnell, D. A., Silva, D. A., Huang, X. and Kornberg, R. D. (2011). Initiation complex structure and promoter proofreading. *Science* 333, 633-7.

Liu, X., Bushnell, D. A., Wang, D., Calero, G. and Kornberg, R. D. (2010). Structure of an RNA polymerase II-TFIIB complex and the transcription initiation mechanism. *Science* 327, 206-9.

Lowery, D. M., Lim, D. and Yaffe, M. B. (2005). Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene* 24, 248-59.

Luo, W., Johnson, A. W. and Bentley, D. L. (2006). The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes Dev* 20, 954-65.

M

Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B. and Matzke, A. J. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21, 367-76.

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, 14113-20.

Mayya, V., Lundgren, D. H., Hwang, S. I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J. K., Rodionov, V. and Han, D. K. (2009). Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* 2, ra46.

McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S. and Bentley, D. L. (1997). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* 11, 3306-18.

Meinhart, A. and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* 430, 223-6.

Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19, 1401-15.

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, 24375-82.

Mikhaylova, O., Ignacak, M. L., Barankiewicz, T. J., Harbaugh, S. V., Yi, Y., Maxwell, P. H., Schneider, M., Van Geyte, K., Carmeliet, P., Revelo, M. P., Wyder, M., Greis, K. D., Meller, J. and Czyzyk-Krzeska, M. F. (2008). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and Egl-9-Type proline hydroxylases regulate the large subunit of RNA polymerase II in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 28, 2701-17.

Missra, A. and Gilmour, D. S. (2010). Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the Drosophila RNA polymerase II transcription elongation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11301-6.

Mosley, A. L., Pattenden, S. G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J. M., Florens, L., Workman, J. L. and Washburn, M. P. (2009). Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Mol Cell* 34, 168-78.

Munoz, M. J., de la Mata, M. and Kornblihtt, A. R. (2010). The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends Biochem Sci* 35, 497-504.

N

Narita, T., Yamaguchi, Y., Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D. K., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., Endoh, M., Yamada, T. and Handa, H. (2003). Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol Cell Biol* 23, 1863-73.

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

Nguyen, V. T., Kiss, T., Michels, A. A. and Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322-5.

Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.

Nigg, E. A. (2007). Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol* 17, 215-21.

O

Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-51.

Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A. M., Gustafsson, C. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J. Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* 3, 109-18.

P

Palancade, B. and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem* 270, 3859-70.

Park, J. E., Soung, N. K., Johmura, Y., Kang, Y. H., Liao, C., Lee, K. H., Park, C. H., Nicklaus, M. C. and Lee, K. S. (2010). Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell Mol Life Sci* 67, 1957-70.

Parsons, G. G. and Spencer, C. A. (1997). Mitotic repression of RNA polymerase II transcription is accompanied by release of transcription elongation complexes. *Mol Cell Biol* 17, 5791-802.

Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A. and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703-17.

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, 7180-8.

Pei, Y. and Shuman, S. (2002). Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *J Biol Chem* 277, 19639-48.

Phatnani, H. P. and Greenleaf, A. L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-36.

Pirngruber, J., Shchebet, A. and Johnsen, S. A. (2009). Insights into the function of the human P-TEFb component CDK9 in the regulation of chromatin modifications and co-transcriptional mRNA processing. *Cell Cycle* 8, 3636-42.

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.

Q

Qian, Y. W., Erikson, E., Taieb, F. E. and Maller, J. L. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 12, 1791-9.

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, 752-62.

R

Ratner, J. N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S. L. and Bregman, D. B. (1998). Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* 273, 5184-9.

Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J. K., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Pasa-Tolic, L. and Pikaard, C. S. (2009). Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell* 33, 192-203.

Reinberg, D. and Sims, R. J., 3rd. (2006). de FACTo nucleosome dynamics. *J Biol Chem* 281, 23297-301.

Rohmoser, M., Holzel, M., Grimm, T., Malamoussi, A., Harasim, T., Orban, M., Pfisterer, I., Gruber-Eber, A., Kremmer, E. and Eick, D. (2007). Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol* 27, 3682-94.

Rosonina, E., Kaneko, S. and Manley, J. L. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev* 20, 1050-6.

S

Schwer, B. and Shuman, S. (2011). Deciphering the RNA Polymerase II CTD Code in Fission Yeast. *Mol Cell* 43, 311-8.

Seipel, K., Georgiev, O. and Schaffner, W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *EMBO J* 11, 4961-8.

Seki, A., Coppinger, J. A., Jang, C. Y., Yates, J. R. and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 320, 1655-8.

Shilatifard, A., Conaway, R. C. and Conaway, J. W. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem* 72, 693-715.

Sims, R. J., 3rd, Rojas, L. A., Beck, D., Bonasio, R., Schuller, R., Drury, W. J., 3rd, Eick, D. and Reinberg, D. (2011). The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* 332, 99-103.

Spain, M. M. and Govind, C. K. (2011). A role for phosphorylated Pol II CTD in modulating transcription coupled histone dynamics. *Transcription* 2, 78-81.

Spector, D. L. and Lamond, A. I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Steigemann, P. and Gerlich, D. W. (2009). Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. *Trends Cell Biol* 19, 606-16.

Stiller, J. W. and Cook, M. S. (2004). Functional unit of the RNA polymerase II C-terminal domain lies within heptapeptide pairs. *Eukaryot Cell* 3, 735-40.

Stiller, J. W., McConaughy, B. L. and Hall, B. D. (2000). Evolutionary complementation for polymerase II CTD function. *Yeast* 16, 57-64.

T

Taatjes, D. J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35, 315-22.

Taniguchi, E., Toyoshima-Morimoto, F. and Nishida, E. (2002). Nuclear translocation of plk1 mediated by its bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem* 277, 48884-8.

Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 3, 341-8.

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, 6769-75.

V

Verdecia, M. A., Bowman, M. E., Lu, K. P., Hunter, T. and Noel, J. P. (2000). Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* 7, 639-43.

W

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratowski, S. and Handa, H. (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12, 343-56.

Wang, L., Gao, J., Dai, W. and Lu, L. (2008). Activation of Polo-like kinase 3 by hypoxic stresses. *J Biol Chem* 283, 25928-35.

Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W. and Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138, 1019-31.

Werner-Allen, J. W., Lee, C. J., Liu, P., Nicely, N. I., Wang, S., Greenleaf, A. L. and Zhou, P. (2011). cis-Proline-mediated Ser(P)5 dephosphorylation by the RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase Ssu72. *J Biol Chem* 286, 5717-26.

West, M. L. and Corden, J. L. (1995). Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics* 140, 1223-33.

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

West, S. and Proudfoot, N. J. (2008). Human Pcf11 enhances degradation of RNA polymerase II-associated nascent RNA and transcriptional termination. *Nucleic Acids Res* 36, 905-14.

Winkles, J. A. and Alberts, G. F. (2005). Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene* 24, 260-6.

Wood, A. and Shilatifard, A. (2006). Bur1/Bur2 and the Ctk complex in yeast: the split personality of mammalian P-TEFb. *Cell Cycle* 5, 1066-8.

Workman, J. L. (2006). Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev* 20, 2009-17.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P., Wu, C. & Allis, C. D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86-90.

X

Xiang, K., Nagaike, T., Xiang, S., Kilic, T., Beh, M. M., Manley, J. L. and Tong, L. (2010). Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature* 467, 729-33.

Xiao, T., Kao, C. F., Krogan, N. J., Sun, Z. W., Greenblatt, J. F., Osley, M. A. and Strahl, B. D. (2005). Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 25, 637-51.

Xie, S., Wang, Q., Wu, H., Cogswell, J., Lu, L., Jhanwar-Uniyal, M. and Dai, W. (2001). Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. *J Biol Chem* 276, 36194-9.

Xu, Y. X., Hirose, Y., Zhou, X. Z., Lu, K. P. and Manley, J. L. (2003). Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II. *Genes Dev* 17, 2765-76.

Xu, Y. X. and Manley, J. L. (2004). Pinning down transcription: regulation of RNA polymerase II activity during the cell cycle. *Cell Cycle* 3, 432-5.

Xu, Y. X. and Manley, J. L. (2007). Pin1 modulates RNA polymerase II activity during the transcription cycle. *Genes Dev* 21, 2950-62.

Y

Yakovchuk, P., Goodrich, J. A. and Kugel, J. F. (2011). B2 RNA represses TFIIH phosphorylation of RNA polymerase II. *Transcr* 2, 45-49.

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, 227-37.

Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T. and Handa, H. (2002). Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol* 22, 2918-27.

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

Yang, Y., Bai, J., Shen, R., Brown, S. A., Komissarova, E., Huang, Y., Jiang, N., Alberts, G. F., Costa, M., Lu, L., Winkles, J. A. and Dai, W. (2008). Polo-like kinase 3 functions as a tumor suppressor and is a negative regulator of hypoxia-inducible factor-1 alpha under hypoxic conditions. *Cancer Res* 68, 4077-85.

Z

Zeng, C., Kim, E., Warren, S. L. and Berget, S. M. (1997). Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity. *EMBO J* 16, 1401-12.

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, 2290-6.

Zhovmer, A., Oksenysh, V. and Coin, F. (2010). Two sides of the same coin: TFIIH complexes in transcription and DNA repair. *ScientificWorldJournal* 10, 633-43.

Zimmerman, W. C. and Erikson, R. L. (2007). Polo-like kinase 3 is required for entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1847-52.

6. Anhang

0132-0000-2	AKT1	0433-0000-1	MARK3
0300-0000-1	ARK5	0385-0000-1	MEK1 (SESE)
0166-0000-1	Aurora A	0550-0000-3	MEK1 wt
0190-0000-1	Aurora B	0380-0000-1	MAPKAPK5
0315-0000-1	Aurora C	0396-0000-1	MKK6
0403-0000-1	B-RAF	0286-0000-1	MST4
0181-0000-1	BRK	0445-0000-1	MYLK
0406-0000-1	Casein Kinase 1 alpha 1	0290-0000-1	NEK2
0124-0000-1	Casein Kinase 2 alpha 1	0209-0000-1	NEK6
0412-0000-1	Casein Kinase 2 alpha 2	0253-0000-1	NLK
0382-0000-1	CDC42BPB Kinase	0344-0000-1	NIK
0134-0135-1	CDK 1/Cyclin B	0443-0000-1	p38-alpha
0134-0055-1	CDK 1/Cyclin E	0357-0000-1	PAK1
0050-0054-1	CDK 2/Cyclin A	0185-0000-2	PBK
0050-0055-1	CDK 2/Cyclin E	0189-0000-1	PCTAIRE
0212-0055-1	CDK 3/Cyclin E	0353-0000-1	PDK1
0142-0143-1	CDK 4/Cyclin D1	0186-0000-1	PIM1
0142-0373-1	CDK 4/Cyclin D3	0223-0000-1	PIM2
0356-0389-1	CDK 5/p25NCK	0437-0000-1	PLK3
0356-0355-1	CDK 5/p35NCK	0183-0000-1	PLK1
0051-0143-1	CDK 6/Cyclin D1	0222-0000-1	PKC-alpha
0366-0360-4	CDK 7/Cyclin H	0232-0000-1	PKC-delta
0376-0390-1	CDK 8/Cyclin C	0420-0000-1	PKC-eta
0371-0345-1	CDK 9/Cyclin T	0204-0000-1	PKC-gamma
0282-0000-1	CHK1	0115-0000-1	PKC-mu
0447-0000-1	CLK1	0207-0000-1	PRK1 protein kinase N'
0180-0000-1	COT (MAP3K8)	0347-0000-1	ROCK2
0332-0000-1	DAPK1	0318-0000-2	SK6 S6 kinase
0634-0000-7	ERK2	0306-0000-1	SAK
0533-0000-1	FER	0199-0000-2	SGK1
0446-0000-1	FRK (RAK)	0198-0000-2	SGK2
0310-0000-1	GSK3-beta	0414-0000-1	SNARK
0444-0000-1	HRI	0200-0000-1	SRC
0258-0000-1	IKK-beta	0277-0000-1	SNK
0320-0000-1	IKK-epsilon	0434-0000-1	SRPK1
0268-0000-1	IARK4	0381-0000-1	SRPK2
0419-0000-1	JNK1	0187-0000-1	TSF1
0214-0000-1	JNK3	0220-0000-1	TSK2
0633-0000-1	MAPKAPK3	0284-0000-1	TTK
0432-0000-1	MARK1	0302-0000-1	VRK1

Abbildung A1: Kinaseliste (ProQinase). Liste der aufgereinigten Kinasen, die in ELISA-Experimenten auf ihre Fähigkeiten, die Pol-II-CTD spezifisch an der Aminosäure Threonin-4 zu phosphorylieren, getestet wurden.

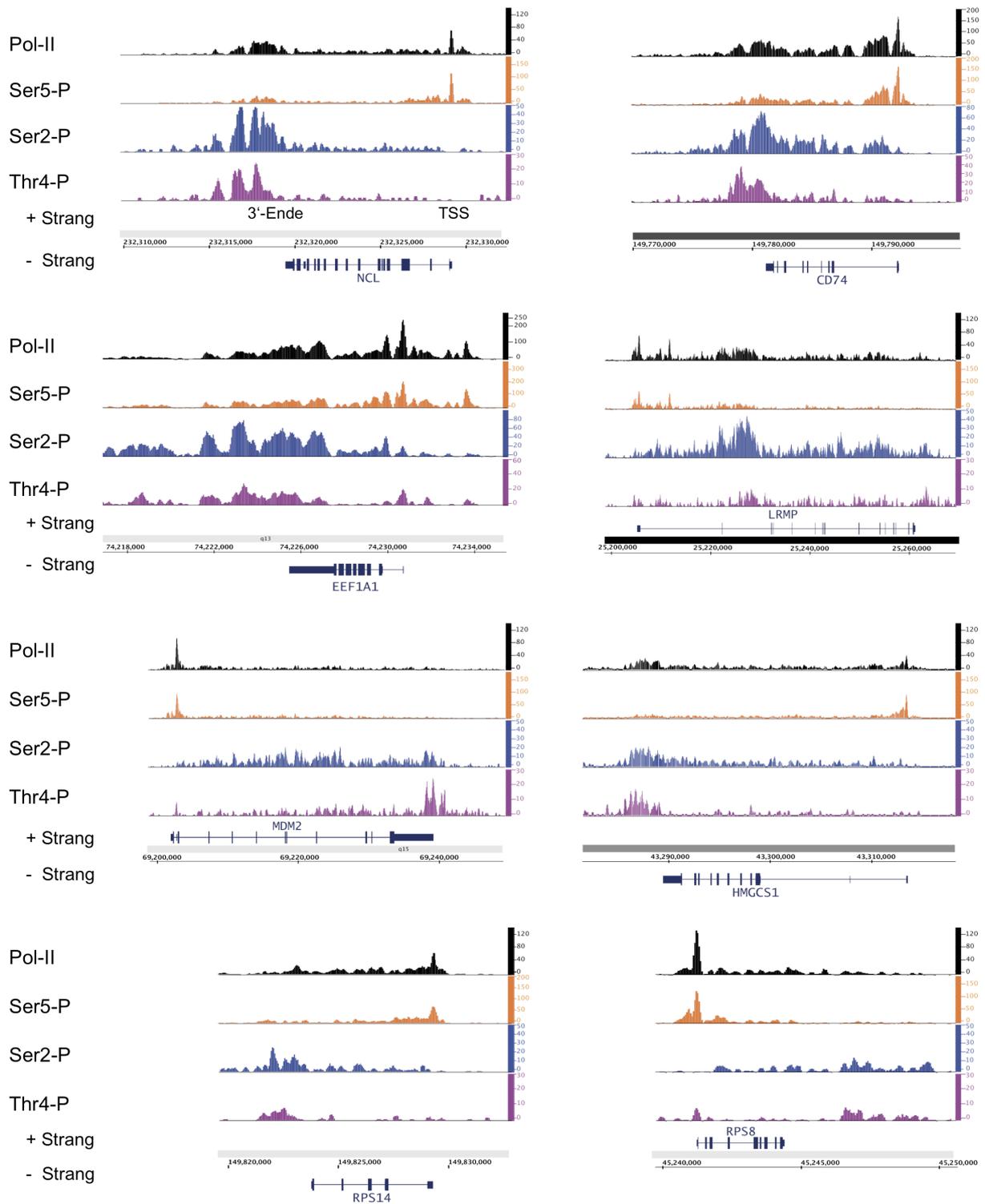


Abbildung A2: Profile für die genomweite Verteilung der Pol-II und der CTD-Phosphorylierungen an ausgewählte Genen. Die normalisierten ChIP-Seq-Signale sind für jeden Antikörper an der y-Achse erkennbar. Unterhalb der ChIP-Seq-Profile ist die Lage des Gens auf dem positiven (+) oder negativen (-) Strang angezeichnet und repräsentativ an einem Gen auch die Transkriptionsstartstelle (TSS) und die RNA-Prozessierungsstelle (3'-Ende).

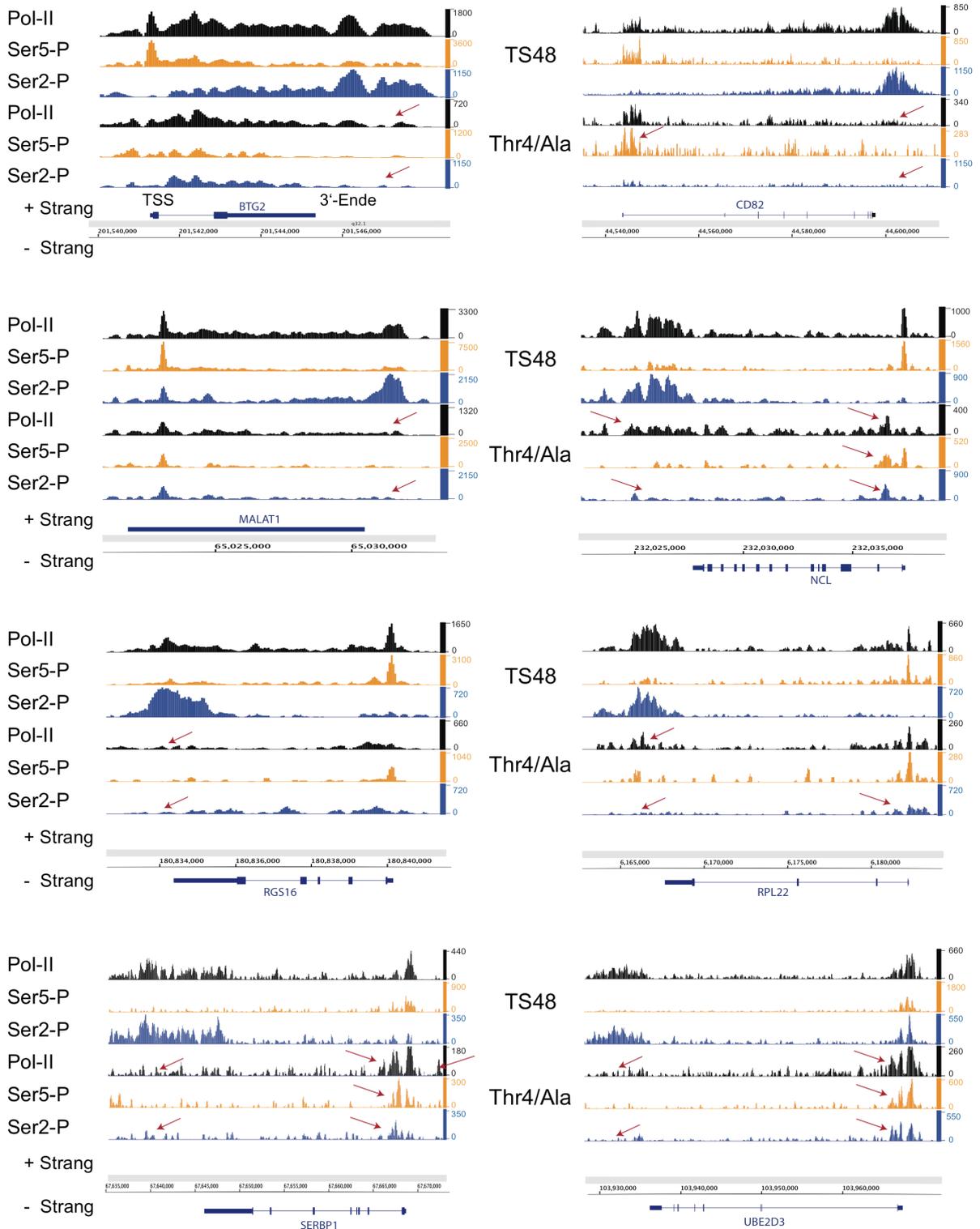


Abbildung A3: Vergleich der Pol-II- sowie der Serin-2- und der Serin-5-Phosphorylierungsprofile der TS48- und der Thr4/Ala-Mutante für einzelne Gene. Die normalisierten ChIP-Seq-Signale sind für jeden Antikörper an der y-Achse erkennbar. Unterhalb der ChIP-Seq-Profile ist die Lage des Gens auf dem positiven (+) oder negativen (-) Strang angezeichnet und repräsentativ an einem Gen auch die Transkriptionsstartstelle (TSS) und die RNA-Prozessierungsstelle (3'-Ende). Die Veränderungen in den ChIP-Seq-Bindungsprofilen, durch die rekombinante CTD-Mutante Thr4/Ala, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dirk Eick für sein stetes Interesse, die vielen Ratschläge und wertvollen Diskussionen während der gesamten Doktorarbeit bedanken.

Ich danke auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Eick-Labors Dr. Rob Chapman, Dr. Anastassia Malamoussi, Roland Schüller, Bastian Mühl, Dr. Thomas Harasim, Anita Gruber-Eber, Kaspar Burger, Markus Kellner und Dr. Michaela Rohrmoser für ihre Unterstützung und die gute Atmosphäre, die in der Arbeitsgruppe geherrscht hat. Besonderer Dank an Kirsten Voß und Dr. Martin Heidemann, für die gute Zusammenarbeit, für viele Diskussionen und die gegenseitige Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Elisabeth Kremmer und Andrew Flatley für die Herstellung der Antikörper, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Bei Dr. Jean-Christophe Andrau und Fred Koch möchte ich mich für die gute und erfolgreiche Kooperation bedanken.

Vielen Dank auch an Manuel Deutsch für die Hilfe und Unterstützung bei der Konfokal-Mikroskopie.

Allen Personen des Helmholtz Zentrums möchte ich danken, die für den reibungslosen Ablauf meiner Tätigkeit am Institut gesorgt haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützt und motiviert hat.