

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

**Methylierung und Ubiquitinierung der Nicht-Konsensus-  
Aminosäure Lysin in der carboxy-terminalen Domäne der RNA-  
Polymerase II**



**Kirsten Voß**

**München, Juni 2015**

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

# Eidesstattliche Erklärung

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

München, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Kirsten Voß)

# Erklärung

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

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

München, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Kirsten Voß)

Dissertation eingereicht am 30.06.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
2. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Conradt

Mündliche Prüfung am 25.11.2015

### Zusammenfassung

Die carboxy-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit der RNA Polymerase II (RNAPII), Rpb1, ist in Vertebraten aus 52 Heptad-Wiederholungen mit der Konsensus-Sequenz  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$  aufgebaut. Der proximale Teil der CTD enthält vorwiegend Heptad-Wiederholungen mit dem Konsensus-Motiv, wohingegen Heptade im distalen Teil der CTD von der Konsensus-Sequenz abweichen. Das Serin an Position sieben in der CTD ist am schwächsten konserviert und achtmal durch Lysin ersetzt. In massenspektrometrischen Analysen konnte ich zeigen, dass Lysin7 sowohl acetyliert, als auch mono-, di- und tri-methyliert vorliegen kann. Nicht modifizierte oder mono-methylierte Lysine treten gehäuft in der nicht-phosphorylierten RNAPII auf, während acetyliertes, sowie di- und tri-methyliertes Lysin vor allem in der phosphorylierten RNAPII vorkommt. Der monoklonale Antikörper 1F5 erkennt ein mono- und di-methyliertes Lysin7 in der CTD und in Übereinstimmung mit den massenspektrometrischen Daten in der Western Analyse die nicht-phosphorylierte A-Form der RNAPII. Immunpräzipitations-Analysen (ChIP) mit dem 1F5-Antikörper belegen, dass die CTD der RNAPII an der Transkriptionsstartstelle am stärksten methyliert ist.

In einer massenspektrometrischen Analyse wurde das Interaktom einer rekombinanten Wildtyp-Polymerase (recWT) mit einer Polymerase (Con48) verglichen, die nur Konsensus-Wiederholungen enthält. Der Vergleich der Interaktome zeigte keine Unterschiede. Beide Polymerasen assoziieren mit großen multimeren Komplexen wie dem Mediator, Integrator und dem Proteasom, sowie mit einem Chaperon-Komplex (Prefoldin-R2TP-Komplex), Enzymen für die RNA-Prozessierung (Spleißing Faktor SFRS15) und den E3-Ubiquitin-Ligasen ITCH, WWP1 und WWP2, die funktional eng mit dem Proteasom verknüpft sind und zur HECT-Familie gehören. In dieser Arbeit habe ich die Assoziation von WWP1 mit der RNAPII untersucht. WWP1 bindet unabhängig von den Nicht-Konsensus-Wiederholungen an die hypophosphorylierte CTD und die Bindung erfolgt über die WW-Domäne. Zwei benachbarte Tyrosine in der CTD sind wichtig für die Erkennung durch die WW-Domänen. *In vitro* kann WWP1 CTD-Peptide an Lysin7 ubiquitinieren. Die Überexpression von  $\Delta WW$ , eine WWP1-Mutante mit einer Deletion der WW-Domäne, führt zu einem dominant-negativen Phänotyp für die Proliferation. Weiterhin führt die Überexpression von  $\Delta WW$  zu einem verzögerten Abbau von RNAPII in

## Zusammenfassung

---

Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden. Die Lysine in der CTD spielen damit ebenfalls eine wichtige Rolle für den Abbau von RNAPII nach DNA-Läsionen. Mit der Lysin7-Methylierung und –Ubiquitinierung konnte das Modifikationsspektrum der CTD um wichtige Modifikationen erweitert werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die CTD der RNA-Polymerase II	1
1.2. Die Rolle der CTD im Transkriptionszyklus und bei der RNA-Prozessierung	4
1.2.1 Die Initiation der Transkription	4
1.2.2. Die Elongation und die Transkription durch das Chromatin	6
1.2.3. Die Termination der Transkription und die 3'Prozessierung der mRNA	9
1.3. Abseits des Transkriptionszyklus – Weitere regulatorische Funktionen der CTD	11
1.4. Posttranslationale Modifikationen der CTD	12
1.4.1. Serin-Phosphorylierungen	12
1.4.2. Threonin4-Phosohorylierung	13
1.4.3. Tyrosin1-Phosphorylierung	14
1.4.4. Prolin-Isomerisierung	15
1.4.5. Arginin-Methylierung	15
1.4.6. Lysin-Acetylierung	16
1.5. Aufgabenstellung	17
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1. Materialien	18
2.1.1. Chemikalien	18
2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Kits	19
2.1.3. Geräte	20

2.1.4. Software	21
2.1.5. Puffer und Lösungen	22
2.1.6. Peptide	27
2.1.7. Antikörper	27
2.1.8. Oligonukleotide	28
2.1.9. Bakterienstamm	29
2.1.10. Zelllinien	29
2.1.11. Plasmide	29
2.2. Methoden	31
2.2.1. Zellkultur	31
2.2.1.1. Kultivierung von Zellen	31
2.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl	32
2.2.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	32
2.2.1.4. Stabile Transfektion von Raji-B-Zellen	33
2.2.1.5. Transfektion von adhärenenten Zellen	33
2.2.2. Messung der Zellproliferation	33
2.2.3. Cisplatin-Stress	34
2.2.4. Western Analyse	34
2.2.4.1. Herstellen von Zellextrakten	34
2.2.4.2. SDS-PAGE und Western Blot	34
2.2.5. Silberfärbung	35
2.2.6. Massenspektrometrische Methoden	36
2.2.6.1. Massenspektrometrische Analyse des RNAPII Interaktoms	36
2.2.6.2. Massenspektrometrische Analyse der RNAPII-CTD Modifikationen	36
2.2.6.3. Trypsin-Gel-Verdau	36

2.2.6.4. Anreicherung von phosphorylierten Peptiden mit Titandioxid (TiO <sub>2</sub> )	37
2.2.6.5. Flüssigkeitschromatographie – Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	38
2.2.7. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	38
2.2.8. Immunpräzipitation	39
2.2.9. Proteinanreicherung über den FLAG-Tag	40
2.2.10.1. <i>In vitro</i> Ubiquitinierung	40
2.2.11. <i>In vitro</i> Phosphorylierung von GST-CTD	41
2.2.12. Klonierung	41
2.2.12.1. Herstellen chemokompetenter <i>E.coli</i>	41
2.2.12.2. Transformation von <i>E.coli</i>	41
2.2.12.3. Isolierung von Plamid-DNA (Mini- und Maxiprep)	42
2.2.12.4. Restriktionsverdau	43
2.2.12.5. DNA-Ligation	43
2.2.12.6. DNA Agarose-Gel-Elektrophorese und DNA-Extraktion	43
2.2.12.7. RNA-Extraktion	43
2.2.12.8. cDNA-Synthese	44
2.2.12.9. Klonieren von WWP1 aus cDNA	44
2.2.12.10. Klonierung in pSfiExpress- und pRTS-Vektoren	45
2.2.11.11. PCR-Mutagenese	45
2.2.12.12. Klonierung der RNAPII-CTD-Mutanten	46
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1. Charakterisierung des 1F5-Antikörpers <i>in vitro</i>	48
3.2. Charakterisierung des 1F5-Antikörpers für zelluläre Epitope	51

3.2.1. Die CTD-Lysin7-Methylierung in zellulären Extrakten	52
3.2.2. Untersuchung von CTD-Mutanten mit dem 1F5-Antikörper	53
3.2.3. Das Auftreten der Lysin7-Methylierung mit anderen CTD-Modifikationen	54
3.3. Massenspektrometrische Analyse der Lysin7-Methylierung	56
3.3.1. CTD-Lysin7 ist mono-, di- und trimethyliert	57
3.4. Genomweites Profil der CTD-Lysin7-Methylierung	60
3.5. Der Vergleich Con48 und recWT – Ähnlich aber nicht gleich?	62
3.5.1. Das Interaktom der recWT- und Con48-Polymerase	64
3.6. Interagiert die E3-Ubiquitin-Ligase WWP1 mit der RNAPII?	68
3.6.1. Expression von WWP1-Mutanten	70
3.6.2. Die Interaktion von WWP1 und der CTD	72
3.6.3. Der Einfluss von CTD-Modifikationen auf die Interaktion von WWP1 mit der RNAPII	73
3.6.4. CTD-Phosphorylierungen inhibieren die Interaktion von WWP1 und der RNAPII-CTD	75
3.6.5. CTD-Tyrosin1 ist essentiell für die Bindung von WWP1	76
3.6.6. WWP1 ubiquitiniert CTD-Peptide <i>in vitro</i>	78
3.6.7. Die Überexpression der $\Delta$ WW-Mutante inhibiert die Zellproliferation	80
3.6.8. Die Überexpression der $\Delta$ WW-Mutante beeinflusst die Wirkung von Cisplatin	81
<b>4. Diskussion</b>	<b>83</b>
4.1. Erweiterung des CTD-Codes – Die Methylierung des Lysin7 in der CTD	83
4.2. Das Zusammenspiel von K7-Methylierung und –Acetylierung	86
4.3. Con48 – Die Reduktion auf das Wesentliche	88

4.4. Das Interaktom der RNAPII	90
4.5. Die Interaktion von WWP1 und der RNAPII	92
4.6. WWP1 eine Rpb1 E3-Ubiquitin-Ligase	94
4.7. Der dominant-negative Phänotyp der $\Delta$ WW-Mutante	95
4.8. Die Modifikationen des Lysin7 der CTD während der Transkription	97
4.9. Ausblick	99
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>115</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>127</b>

## 1. Einleitung

Die DNA ist der Speicher der genetischen Information und die Transkription der erste Schritt, um diese zu entschlüsseln. In Prokaryonten wird diese Aufgabe durch eine DNA-anhängige RNA-Polymerase (RNAP) erfüllt. Höhere Eukaryonten besitzen drei strukturell verwandte DNA-abhängige RNA Polymerasen (RNAPI, RNAPII, RNAPIII), die jeweils für die Transkription bestimmter Genklassen verantwortlich sind. Die RNAPI transkribiert die ribosomalen Gene und erzeugt ein primäres Transkript, das weiter zur 5,8S, 18S und 28S rRNA prozessiert wird. Für die Synthese kurzer RNAs wie tRNAs, 5S rRNA oder U6 snRNA ist die RNAPIII verantwortlich (Werner et al., 2009). Die RNAPII transkribiert alle proteinkodierenden mRNAs, gespleißte nicht-kodierende RNAs, sowie snoRNAs, snRNA und miRNAs. Alle drei eukaryontischen RNA-Polymerasen haben einen ähnlichen Aufbau. Hervorzuheben ist die größte Untereinheit der RNAPII, Rpb1, welche sich durch die carboxy-terminale Domäne (CTD) deutlich von der RNAPI und RNAPIII unterscheidet und Schwerpunkt meiner Untersuchungen in dieser Arbeit ist.

### 1.1. Die CTD der RNA-Polymerase II

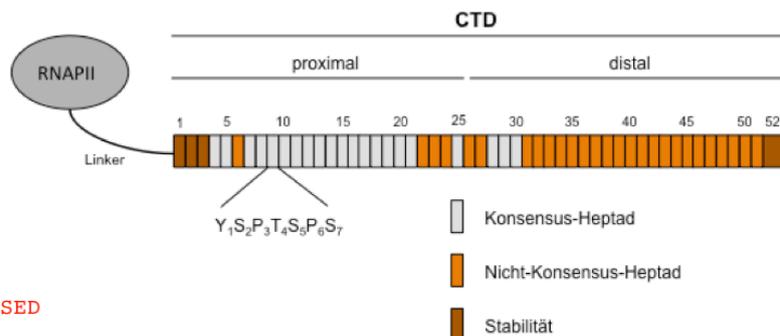
Die CTD der großen Untereinheit Rpb1 ist konserviert vom Reich der Pilze bis zum Menschen und besteht in Vertebraten aus 52 Heptad-Wiederholungen mit der Konsensus-Sequenz Tyrosin<sub>1</sub>-Serin<sub>2</sub>-Prolin<sub>3</sub>-Threonin<sub>4</sub>-Serin<sub>5</sub>-Prolin<sub>6</sub>-Serin<sub>7</sub> (Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub>). Die CTD ist mit der RNAPII über einen Linker verbunden. Der proximale Teil der CTD besteht aus 21 Heptad-Wiederholungen mit der charakteristischen Konsensus-Sequenz. Heptade im distalen Teil der CTD sind durch Abweichungen von der Konsensus-Sequenz in Form von Aminosäuresubstitutionen gekennzeichnet (Corden, 2013). Für die Stabilität der CTD sind die ersten drei Nicht-Konsensus-Wiederholungen und die letzten zehn Aminosäuren am C-Terminus der CTD essentiell (Chapman et al., 2005) (Abb. 1B).

# Einleitung

**A**

	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
1	YSPTSPA	1 SPSVSPS	1 YGLTSPS	1 FGVSSPG
2	YEP <span style="color:red">RSPGG</span>	2 YSPTSPN	2 YSPSSPG	2 FSPTSPT
3	YTPQSPS	3 Y <span style="color:red">TASS</span> PGG	3 YS-TSPA	3 YSPTSPA
4	YSPTSPS	4 <span style="color:red">ASP---</span> N	4 YMPSSPS	4 YSPTSPS
5	YSPTSPS	5 YSPSSPN	5 YSPTSPS	5 YSPTSPS
6	YSPTSPN	6 YSPTSP <span style="color:red">L</span>	6 YSPTSPS	6 YSPTSPS
7	YSPTSPS	7 <span style="color:red">YA--</span> SPR	7 YSPTSPS	7 YSPTSPS
8	YSPTSPS	8 <span style="color:red">YAST</span> TPN	8 YSPTSPS	8 YSPTSPS
9	YSPTSPS	9 FNPQSTG	9 <span style="color:red">YSAT</span> SPS	9 YSPTSPS
10	YSPTSPS	9 YSPSSSG	10 YSPTSPS	10 YSPMSPS
11	YSPTSPS	11 YSPTSPV	11 YSPTSPS	11 YSPTSPS
12	YSPTSPS	12 YSPTSPV-Q	12 YSPTSPS	12 YSPTSPS
13	YSPTSPS	13 <span style="color:red">FQ-</span> SSPS	13 YSPTSPS	13 YSPTSPS
14	YSPTSPS	14 <span style="color:red">FAGSGSNI</span>	14 YSPTSPS	14 YSPTSPS
15	YSPTSPS	15 YSPGN-A	15 YSPTSPS	15 YSPTSPS
16	YSPTSPS	16 YSPSSSN	16 YSPTSPS	16 YSPTSPS
17	YSPTSPS	17 YSPNSPS	17 YSPTSPS	17 YSPTSPA
18	YSPTSPS	18 YSPTSPS	18 YSPTSPS	18 YSPTSPS
19	YSPTSPS	19 YSPSSPS	19 YSPTSPS	19 YSPTSPS
20	YSPTSPS	20 YSPTSPC	20 YSPTSPS	20 YSPTSPS
21	YSPTSPS	21 YSPTSPS	21 YSPTSPS	21 YSPTSPS
22	YSPTSPN	22 YSPTSPN	22 YSPTSPS	22 YSPTSPN
23	YSPTSPN	23 <span style="color:red">YTPV</span> TPS	23 YSPTSPS	23 YSPTSPS
24	<span style="color:red">YTPT</span> SPS	24 YSPTSPN	24 YSPTSPS	24 YSPTSPG
25	YSPTSPS	25 <span style="color:red">YS-ASPQ</span>	25 YSPTSPS	25 YSPGSPA
26	YSPTSPN	26 YSPASPA	26 YSPTSPS	26 YSP <span style="color:red">LQDEQLH</span> NENENS <span style="color:red">R</span>
27	<span style="color:red">YTPT</span> SPN	27 <span style="color:red">YSQT</span> GVK	27 YSPTSPS	
28	YSPTSPS	28 YSPTSP <span style="color:red">T</span>	28 YSPTSPS	
29	YSPTSPS	29 YSP <span style="color:red">P</span> SPS	29 YSPTSPS	
30	YSPTSPS	30 YSPGSPQ		
31	YSPSSPR	31 <span style="color:red">YTPG</span> SPQ		
32	<span style="color:red">YTPQ</span> SPT	32 YSP <span style="color:red">ASP</span> K		
33	<span style="color:red">YTPS</span> SPS	33 YSPTSP <span style="color:red">L</span>		
34	YSPSSPS	34 YSPSSPQ		
35	YSPTSPK	35 <span style="color:red">HSPSN-Q</span>		
36	<span style="color:red">YTPT</span> SPS	36 YSPTG <span style="color:red">ST</span>		
37	YSPSSPE	37 <span style="color:red">YSAT</span> SPR		
38	<span style="color:red">YTPT</span> SPK	38 YSPNMSI		
39	YSPTSPK	39 YSPSSPK		
40	YSPTSPK	40 YSPTSP <span style="color:red">T</span>		
41	YSPTSP <span style="color:red">T</span>	41 <span style="color:red">YTPTARN</span>		
42	YSPTTPK	42 YSPTSPM		
43	YSPTSP <span style="color:red">T</span>	43 YSPT <span style="color:red">APSH</span>		
44	YSPTSPV	44 YSPTSPA		
45	<span style="color:red">YTPT</span> SPK	45 YSP <span style="color:red">SSPTFEE</span> SED		
46	YSPTSP <span style="color:red">T</span>			
47	YSPTSPK			
48	YSPTSP <span style="color:red">T</span>			
49	YSPTSP <span style="color:red">K</span> GST			
50	YSPTSPG			
51	YSPTSP <span style="color:red">T</span>			
52	YSLTSP <span style="color:red">AISPDDS</span> DEEN			

**B**



**Abbildung 1: Die Architektur der RNAPII-CTD.** A) Aminosäuresequenz der CTD von *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae*. Abweichungen von der Konsensussequenz sind in rot markiert. B) Schematische Darstellung der humanen RNAPII-CTD. Graue Heptade entsprechen der Konsensus-Sequenz, farbige Heptade den Nicht-Konsensus-Wiederholungen. Indiziert sind Linker, proximale und distale CTD.

Die Struktur und der Aufbau der CTD variieren zwischen einzelnen Organismen. Die CTD der Hefe *S. cerevisiae* besteht aus 26 Heptad-Wiederholungen, die der Spalthefe *S. pombe* aus 29, von *D. melanogaster* aus 45 und die CTD aller Vertebraten aus 52 Heptad-Wiederholungen. Innerhalb der Klasse der Säugetiere ist die CTD zu 100% konserviert (Chapman et al., 2008). Phylogenetische Analysen legen eine Korrelation zwischen der Anzahl der Konsensus-Wiederholungen und der Komplexität der Organismen nahe (Stiller et al., 2002) (Abb. 1A).

Die genaue Betrachtung der CTD-Aminosäuresequenz in Säugern zeigt, dass Tryrosin<sup>1</sup>, Prolin<sup>3</sup> und Prolin<sup>6</sup> die am stärksten konservierten Aminosäuren in der CTD sind und in allen 52 Heptad-Wiederholungen auftreten. Dagegen wird Serin<sup>7</sup> in nur 26 Heptaden gefunden und ist somit die am schwächsten konservierte Aminosäure. Häufig werden an Stelle von Serin<sup>7</sup> die Aminosäuren Lysin, Threonin oder Asparaginsäure gefunden.

Genetische Analysen konnten zeigen, dass die Deletion der CTD in Hefe, *Drosophila* und Säugern letal ist, obwohl die enzymatische Aktivität der RNAPII *in vitro* durch die Deletion nicht beeinträchtigt ist. Weitere Experimente zeigten, dass Zellen auch mit einer reduzierten Anzahl an Heptad-Wiederholungen proliferieren und dass etwa zweidrittel der Heptad-Wiederholungen für eine normale Zellproliferation ausreichend sind (Allison et al., 1988, Brickey 1995, Bartolomei et al., 1988, Nonet et al., 1989, Meininghaus et al., 2000). Die Konsensus- und Nicht-Konsensus-Wiederholungen sind in Säugern funktional nicht äquivalent, da CTD-Mutanten die nur aus Nicht-Konsensus-Wiederholungen bestehen letal sind (Chapman et al., 2005).

Die Tandem-Anordnung der Heptad-Wiederholungen in der CTD suggeriert, dass die funktionale Einheit eine Konsensus-Wiederholung umfasst. In der Hefe konnte die Arbeitsgruppe um John Stiller zeigen, dass die Insertion von einem Alanin nach jedem Heptad letal ist, während die Insertion von einem Alanin nach jedem zweitem Heptad toleriert wird (Stiller et al., 2004). Durch diese Experimente konnte bewiesen werden, dass die CTD aus funktionalen Einheiten aufgebaut ist, die mehr als eine Konsensus-Wiederholung umfassen. Eine funktionale Einheit beinhaltet eine komplette Heptad-Wiederholung und die nächsten vier Aminosäuren (Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>) des folgenden Heptads (Stiller et al., 2004).

Die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren innerhalb einer Heptad-Wiederholung für die Zellproliferation und Viabilität wurde von den Arbeitsgruppen Stiller und Corden in der Hefe untersucht. In *S. cerevisiae* ist die Substitution der Serine an den Positionen

zwei oder fünf in den Heptad-Wiederholungen zu Alanin oder Glutaminsäure letal (West et al., 1995). Der Austausch von Tyrosin1 in den Heptaden zu Phenylalanin ist in *S. cerevisiae* ebenfalls letal, nicht aber in *S. pombe* (West et al., 1995, Schwer et al., 2011). Durch Ersetzen von CTD-Serin2, -5 oder -7 durch Glutaminsäure wird eine phosphorylierte Aminosäure imitiert. Diese Mutationen erzeugen ebenfalls einen letalen Phänotyp und belegen, dass die Aminosäuren zeitweise dephosphoryliert vorliegen müssen (Zhang et al., 2012). Andererseits ist der Austausch von Threonin4 oder Serin7 in der CTD zu Alanin in *S. cerevisiae* nicht letal, aber die Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Stress (Stiller et al., 2000). Im Säuger-Zellsystem ist die CTD-Threonin4/Alanin- und Serin7/Alanin-Mutation dagegen letal (Hintermair et al., 2012).

Die Letalität der meisten Aminosäuresubstitutionen offenbart, dass die CTD und deren Modifikationen eine wichtige Rolle bei der Transkription spielen, die im nächsten Abschnitt erläutert werden soll.

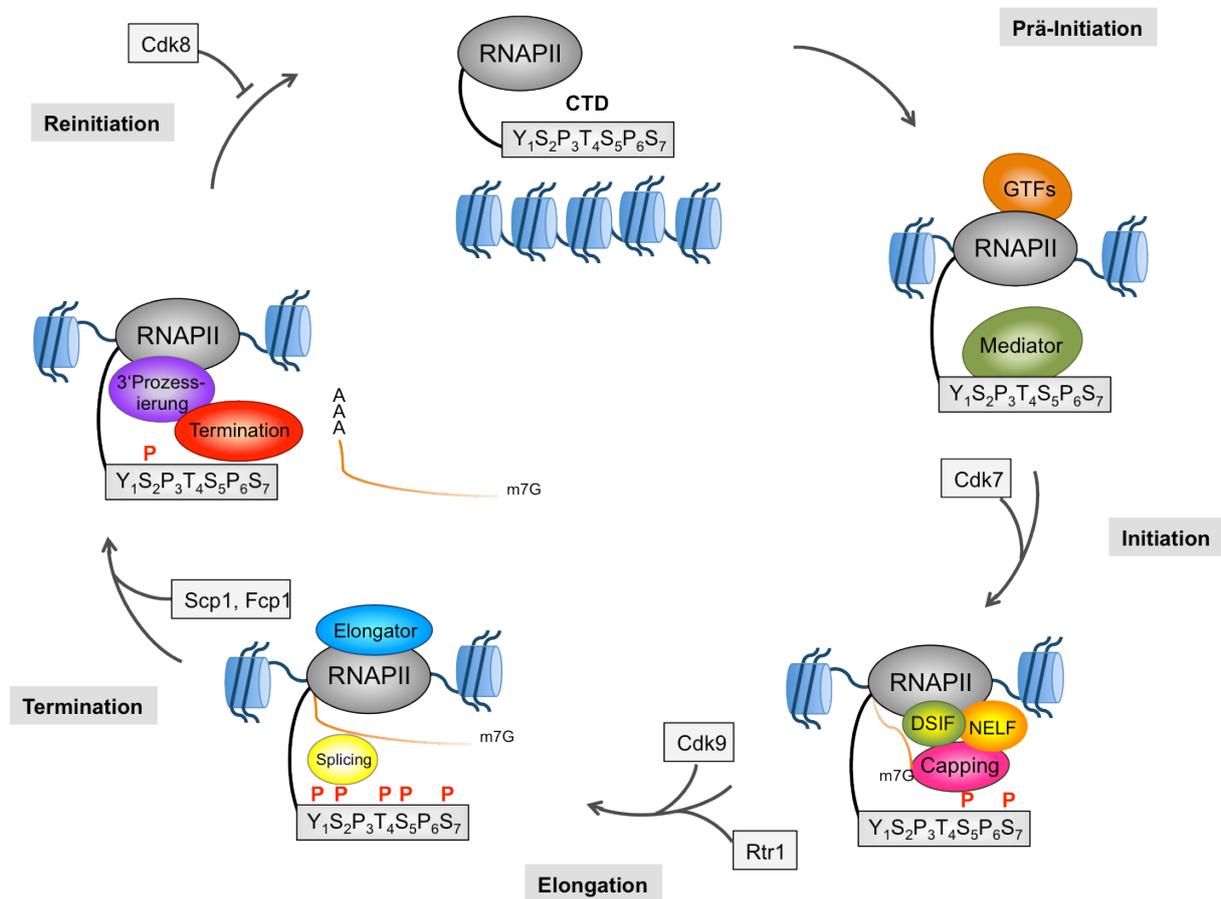
### **1.2. Die Rolle der CTD im Transkriptionszyklus und bei der RNA-Prozessierung**

Der Transkriptionszyklus kann in drei Phasen unterteilt werden: Transkriptionsinitiation, Elongation und Termination. Initiiert wird die Transkription durch die Interaktion der Polymerase mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren und dem Mediator-Komplex. Transkriptionszyklusabhängige Phosphorylierungen der CTD-Aminosäuren führen zur Rekrutierung akzessorischer Proteine, wie Chromatin-Remodelling- oder mRNA-Capping-Faktoren und ermöglichen den Übergang zur Elongationsphase durch die Ablösung der RNAPII vom Promotor. Während der Elongation wird die naszierende mRNA ko-transkriptionell gespleißt und das 3'Ende prozessiert. Der Transkriptionszyklus endet mit der Termination und dem Export der reifen mRNA ins Zytoplasma.

#### **1.2.1. Die Initiation der Transkription**

Die Transkriptionsinitiation beginnt mit der Assemblierung des Prä-Initiationskomplexes (PIC) am Promotor von RNAPII transkribierten Genen. Der PIC besteht aus den allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTF) TFIIA, TFIIB, TFIID,

TFIIE, TFIIF und TFIIH, sowie der RNAPII mit einer hypophosphorylierten CTD und dem Mediator-Komplex (Buratowski et al., 1989).



**Abbildung 2: Der Transkriptionszyklus der RNAPII.** Schematische Darstellung des Transkriptionszyklus. GTF, Mediator und eine RNAPII mit einer unphosphorylierten CTD bilden den PIC. CDK7 phosphoryliert die CTD an Serin5 und Serin7. DSIF und NELF hemmen die produktive Elongation der RNAPII während der Capping-Komplex an die CTD rekrutiert die naszierende mRNA 5' modifiziert. Die Serin2-Phosphorylierung führt zur Dissoziation von DISF und NELF und markiert den Übergang zur Elongation. Dynamische Veränderungen der CTD-Modifikationen durch Kinasen und Phosphatasen (Rtr1, Scp1 und Fcp1) führen zur Bindung des Spleißing-, 3'Prozessierungs- und Terminations-Komplexes. Die reife, gecappte, gespleißte und polyadenylierte mRNA wird ins Zytoplasma transportiert und die dephosphorylierte RNAPII kann erneut initiieren.

Der Mediator-Komplex dient während der PIC-Formierung als Ko-Aktivatoren und ermöglicht die Interaktion der RNAPII mit aktivierenden oder reprimierenden Transkriptionsfaktoren, die oberhalb des Promotors an regulatorische Sequenzen binden (URS: *Upstream regulatory sequences*, AUS: *Upstream activating sequences*) (Kornberg et al., 2007). Unterteilt wird der aus über 30 Untereinheiten bestehende Mediator-Komplex in drei Module: Kopf, Mitte und Schwanz, sowie

einem zusätzlichen Kinase-Module (Guglielmi et al., 2004). Die Mediator Kinase Cdk8/CyclinC kann durch Phosphorylierungen der Serin5-Reste in der CTD den Aufbau des PICs in der frühen Phase der Initiation inhibieren (Hengartner et al., 1998). Nach der Ausbildung des PIC stimuliert der Mediator-Komplex die Kinase-Untereinheit Cdk7 (Hefe Kin28) des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIIF und phosphoryliert die Serine an Position fünf in der CTD (Buratowski, 2009). Phosphorylierungen an CTD-Serin5 durch Cdk7/Kin28 führen zur Ablösung des Mediators von der RNAPII und diese kann den Promotor verlassen. Das Ablösen der RNAPII vom Promotor kennzeichnet den Übergang zur Elongation (Sogaard et al., 2007). Der Mediator verbleibt als Gerüst am Promotor um eine effiziente Reinitiation durch Rekrutierung einer neuen unphosphorylierten RNAPII zu ermöglichen (Yudkovsky et al., 2000) (Abb. 2).

Interessanterweise phosphoryliert Cdk7/Kin28 nicht nur die Serin5-Reste in der CTD, sondern ist auch die primäre Kinase für die CTD-Serin7-Phosphorylierung. Die Serin7-Phosphorylierung ist für die Transkription von snRNAs von Bedeutung, wenngleich die Funktion am Promotor von proteinkodierenden Genen noch unklar ist und später thematisiert werden soll (Egloff et al., 2007, Akhtar et al., 2009).

### **1.2.2. Die Elongation und die Transkription durch das Chromatin**

Nachdem die RNAPII den Promotor verlassen hat, bindet in der frühen Elongationsphase der heterodimere Komplex DSIF (*DRB-sensitivity-inducing factor*) mit den beiden Untereinheiten Spt4/5 die RNAPII (Wada et al., 1998) und dirigiert den negativen Elongationsfaktor NELF an den Transkriptionskomplex, wodurch ein Promotor-proximaler Transkriptionsarrest induziert wird (Yamaguchi et al., 1999). In dieser frühen Phase der Elongation wird die naszierende mRNA direkt nach dem Austritt aus der RNAPII gecappt. Der Capping-Komplex wird über die CTD-Serin5-Phosphorylierung rekrutiert und fügt ein 7-Methylguanosin ( $m^7G$ )-Cap an das 5'Ende der mRNA an, um den Abbau durch 5'-3' Exonukleasen zu verhindern (Moteki et al., 2002, Fabrega et al. 2003, Cramer et al. 2001). Der Übergang zur produktiven Elongation erfolgt mit Hilfe des positiven Transkriptions-Elongationsfaktor B (P-TEFb). P-TEFb ist ein heterodimerer Komplex und phosphoryliert mit der Kinase-Untereinheit Cdk9 sowohl Serin2 in der CTD, sowie NELF und die DSIF-Untereinheit Spt5 (Nechaev et al., 2011, Yamada et al., 2006.) Durch die Phosphorylierung von

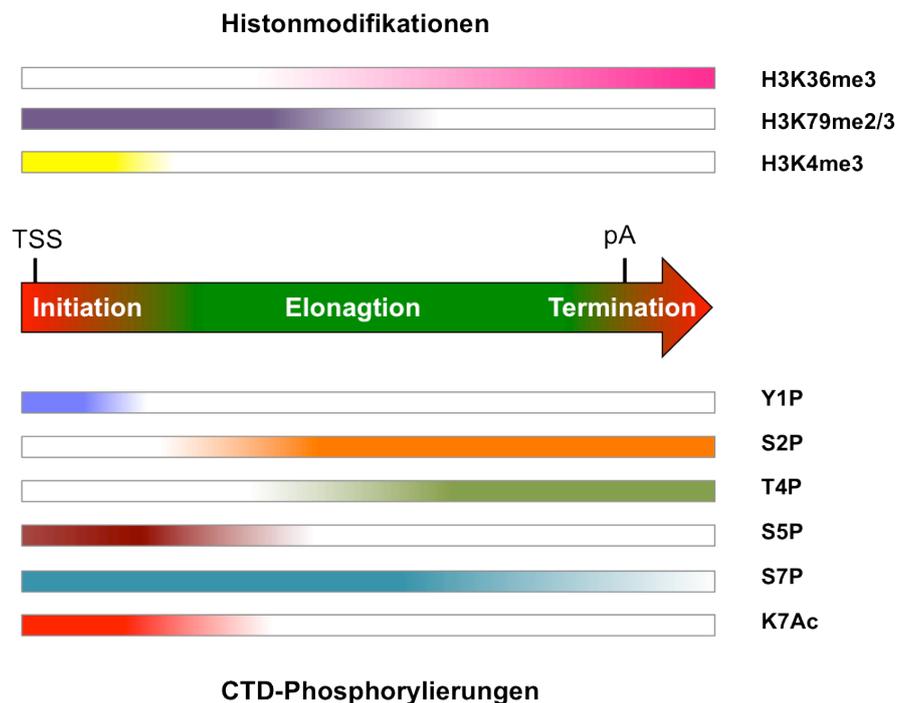
DSIF und NELF kann NELF von der RNAPII dissoziieren und die RNAPII geht in die produktive Phase der Elongation über (Nechaev et al., 2011, Yamada et al., 2006). Cdk9 phosphoryliert die CTD vor allem in der frühen Elongationsphase nahe dem 5'Ende der Gene und stimuliert dadurch die zweite Serin2-Kinase Cdk12. Cdk12 phosphoryliert das Serin2 in der CTD vor allem am 3'Ende der Gene (Bowman et al., 2014). Mit fortschreitender Transkription in Richtung 3'Ende der Gene entfernt die CTD-Phosphatase Rtr1 sukzessive die Serin5 Phosphorylierungen. Gleichzeitig nehmen die Phosphorylierungen der Serin2-Reste weiter zu (Mosley et al., 2009) (Abb. 3).

Die Hyperphosphorylierung der elongierenden RNAPII führt zur Rekrutierung und Aufbau von Spleißosomen, die Introns aus der naszierenden mRNA ko-transkriptionell entfernen (Hirose et al., 1999). In höheren Eukaryonten werden durch alternatives Spleißen multiple Transkripte desselben Gens hergestellt, indem einzelne Exons übersprungen werden und unterschiedliche Spleißstellen genutzt werden (Munoz et al., 2010).

### Die Elongation der RNAPII durchs Chromatin

Die Transkription von Genen durch die RNAPII ist eng verknüpft mit dem Phosphorylierungsstatus der CTD und Veränderungen der Histonmodifikationen. Die Bausteine des Chromatins, die Nukleosomen stellen für die RNAPII eine physikalische Barriere bei der Transkription dar. Nukleosomen sind Oktamere, die aus jeweils zwei der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 bestehen und um die ein 147 Basenpaar langer DNA-Strang gewickelt ist (Kouzarides, 2007). Durch das Zusammenspiel von reversiblen, posttranslationalen Modifikationen der flexiblen Histonschwänze und durch Chromatin-Remodelling-Komplexe wird diese Barriere für die RNAPII gangbar gemacht (Workman, 2006) (Abb. 3). Das gegenwärtige Modell geht davon aus, dass die Nukleosomen nicht komplett entfernt werden, um die Transkription der Gene durch die RNAPII zu ermöglichen. Nur ein H2A/H2B-Heterodimer wird aus dem Nukleosom-Oktamer entfernt, während das verbliebene Hexamer an seiner Position im Chromatin verbleibt, um die epigenetische Information der Nukleosomen zu sichern (Bintu et al., 2012, Bintu et al., 2011). Für die Entfernung der H2A/H2B-Dimere ist das Histon-Chaperons FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) verantwortlich, das über die Monoubiquitinierung von H2B

ans Chromatin dirigiert wird. Die Monoubiquitinierung von H2B wird durch Bre1/Rad6 katalysiert (Belotserkovskaya et al., 2003, Pavri et al., 2006). Bre1/Rad6 wird über den PAF-Komplex, der an eine Serin5 phosphorylierte CTD bindet, zur Transkriptionsmaschinerie rekrutiert. FACT ist wahrscheinlich nicht nur am Herauslösen der H2A/H2B-Dimere beteiligt, sondern beeinflusst auch die Entfernung der H2B-Monoubiquitinierung und die Reassemblierung der Nukleosomen hinter der elongierenden RNAPII (Workman, 2006).



**Abbildung 3: Kommunikation zwischen dem Histon- und CTD-Code in Säugerzellen.** Während des Transkriptionszyklus verändern sich die CTD- und Histonmodifikationen, dargestellt durch farbliche Gradienten: Pink: H3K36me3, Lila: H3K79me2/3, Gelb: H3K4me3, Blau: Tyrosin1P, Orange: Serin2P, Grün: Threonin4P, dunkelrot: Serin5P, Türkis: Serin7P, rot: Lysin7-Acetylierung. Die hypophosphorylierte RNAPII, der Mediator und die GTF formen den PIC. Nach der PIC Assemblierung wird die CTD an Tyrosin1, Serin5 und Serin7 im Initiations-Komplex phosphoryliert. Die Serin5-Phosphorylierung führt zur Tri-Methylierung von H3K4 durch Set1. Nach dem Verlassen des Promotors durch die RNAPII nimmt die Serin5- und Tyrosin1-Phosphorylierung wieder ab, ebenso wie die H3K4me3 Histonmodifikation. Während der Elongation nehmen die Phosphorylierungen an Serin2 und Threonin4 sowie die Tri-Methylierung von H3K36 zu. Die Serin7 Phosphorylierung nimmt vor der Termination wieder ab, während die Serin2 und Threonin4-Phosphorylierungen bis zur Termination erhalten bleiben. P300/KAT3B acetyliert die Lysine-Reste an Position sieben der CTD direkt nach der Initiation und induziert den Promotor-proximalen Transkriptionsarrest.

Ebenfalls über den PAF-Komplex zur Transkriptionsmaschinerie rekrutiert wird die Histonmethyltransferase Set1/COMPASS, die Histon H3K4 in der Nähe der

Transkriptionsstartstelle tri-methyliert und eine aktivierende Wirkung auf die Transkription hat (Hampsey und Reinberg 2003). Während der Transkriptionselongation entsteht in der CTD eine Serin2/5-Doppelphosphorylierung, die von der Histonmethyltransferase Set2 gebunden wird. Set2 tri-methyliert Histon H3K36 im transkribierten Bereich der Gene, wodurch die Elongation unterstützt wird (Kizer et al., 2005). Somit beeinflussen sich der Phosphorylierungsstatus der CTD und die Modifikationen des Chromatins gegenseitig (Abb. 3).

### **1.2.3. Die Termination der Transkription und die 3'Prozessierung der mRNA**

Die CTD ist ebenfalls wichtig bei der 3'Prozessierung von RNAPII-Transkripten durch die Bindung verschiedener 3'Prozessierungsfaktoren, wie CPSF (*Cleavage and polyadenylation specificity factor*), CstF (*Cleavage stimulatory factor*) und Pcf11 (*Pre-mRNA cleavage complex II protein*). Gut untersucht ist die Polyadenylierung von mRNA, die durch einen Zwei-Schritt-Mechanismus katalysiert wird. CPSF und CstF sind Protein-Komplexe aus mehreren Untereinheiten, die das Poly(A)-Signal in der mRNA (AAUAAA) erkennen (McCracken et al., 1997) und die CPSF-Untereinheit CPSF73 katalysiert einen endonukleolytischen Schnitt im primären Transkript. Eine Poly(A)-Polymerase fügt nachfolgend den Poly(A)-Schwanz an das freie 3'Ende der RNA an (Shi et al., 2009).

Von besonderer Bedeutung für die 3'Prozessierung ist die Serin2-Phosphorylierung der CTD. Genomweite Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) zeigen, dass die Serin2-Phosphorylierung und 3' Prozessierungsfaktoren simultan am 3' Ende von Genen akkumulieren (Mayer et al., 2010, 2012; Kim et al., 2010). Die Inhibierung der Serin2-Phosphorylierung durch Flavopiridol verhindert in Metazoen die Rekrutierung von 3'Prozessierungsfaktoren sowie die Polyadenylierung der mRNA (Ni et al 2004). Der 3'Prozessierungsfaktor Pcf11 besitzt N-terminal eine CTD-Interaktions-Domäne (CID) und bindet die CTD in Abhängigkeit von einem phosphorylierten Serin2 (Meinhart et al., 2004).

Verschiedene von der RNAPII transkribierte RNAs, wie snRNAs und Histon-mRNA, werden an ihrem 3'Ende nicht polyadenyliert. Dennoch ist die CTD für die 3' Prozessierung dieser RNAs essentiell. Die Inhibierung der CTD-Serin2-Phosphorylierung verhindert die 3'Prozessierung von snRNAs, wenngleich deren Transkription unverändert bleibt (Medlin et al., 2003). Eine korrekte 3' Prozessierung

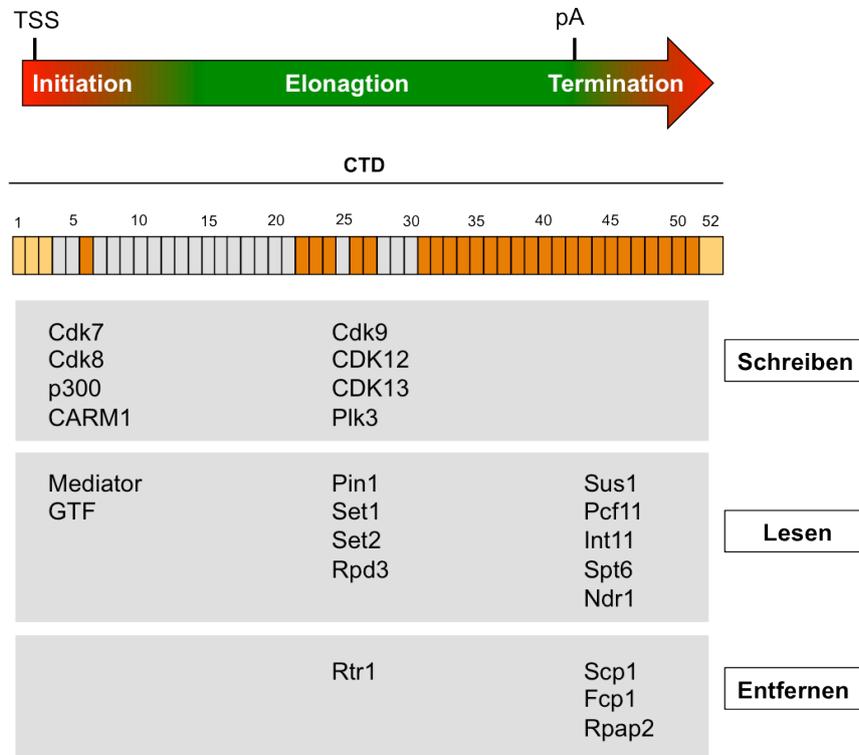
von snRNAs ist abhängig vom Promotor und der 3'Box. Die 3'Box wird von dem Integrator, einem multimeren 3'Prozessierungsfaktor gebunden, der die RNA endonukleolytisch mit der enzymatischen Untereinheit Int11 schneidet (Baillat et al., 2005).

3'Prozessierungsfaktoren sind auch für die Termination der Transkription von Bedeutung. Eine enzymatisch funktionale Pcf11-Mutante mit einer trunkierten CID zeigt in der Hefe einen Terminationsdefekt (Sadowski et al., 2003).

Die Termination der RNAPII-Transkription wird durch zwei Modelle beschrieben, dem allosterischen- und dem Torpedo-Modell. Das allosterische Modell postuliert, dass die Transkription über das Polyadenylierungssignal hinaus zu einem Austausch von Elongations- zu Terminationsfaktoren führt, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Elongationskomplexes kommt und die Dissoziation der RNAPII von der DNA bewirkt wird (Rosonina et al., 2006). Dieses Modell wird durch ChIP-Analysen gestützt, die einen Austausch der Elongationsfaktoren am 3'Ende der Gene belegen (Kim et al., 2004). Das Torpedo-Modell postuliert, dass durch das Schneiden des Transkripts an der Polyadenylierungsstelle ein Substrat für die 5'-3' Exonuklease Xrn2 (Hefe Rat1) geschaffen wird. Xrn2 degradiert die RNA und löst die RNAPII von der DNA (Kim et al., 2004, West et al., 2004). Die Kombination des allosterischen und des Torpedo-Modells erklären die Mechanismen am 3'Ende der Gene vermutlich am besten. Nach der Transkription der Polyadenylierungsstelle verharrt der Elongationskomplex vorübergehend und die naszierende RNA wird vom Polyadenylierungskomplex gespalten. Die 5'-3'-Exonuklease Xrn2/Rat1 degradiert die RNA und rekrutiert gleichzeitig Terminationsfaktoren an das aktive Zentrum der RNAPII, was zur Dissoziation der RNAPII von der DNA-Matrize führt (Rosonina et al., 2006).

Bei beiden Terminationsmodellen wird die RNAPII-CTD durch die Phosphatasen Scp1 (Hefe Ssu72) und Fcp1 am 3'Ende der Gene dephosphoryliert. Die Aktivität von Scp1 wird durch die Prolyl-Isomerase Pin1 (Hefe Ess1) verstärkt. (Albert et al., 1999, Krishnamurthy et al., 2009). Analysen von Kristallstrukturen belegen, dass Ssu72 ein phosphoryliertes Serin nur bindet, wenn das benachbarte Prolin6 in *cis*-Konformation vorliegt (Xiang et al., 2010, Werner-Allen et al., 2011). Scp1/Ssu72 kann ebenfalls Serin7 in der CTD dephosphorylieren (Zhang et al., 2012). Im Gegensatz zu Scp1 ist Fcp1 über die gesamte transkribierte Region mit der RNAPII assoziiert und dephosphoryliert Serin2 (Kong et al., 2005). Die globale

Dephosphorylierung der CTD trägt zur Dissoziation der RNAPII von der DNA bei und ermöglicht die Reinitiation der RNAPII (Cho et al., 1999, Dichtl et al., 2002) (Abb.3, 4).



**Abbildung 4: Zusammenfassung der CTD bindenden Proteine im Verlauf des Transkriptionszyklus.** Die interagierenden Proteine sind in die Kategorien: Schreiben, Lesen und Entfernen unterteilt und klassifiziert nach der Phase in der sie im Transkriptionszyklus aktiv sind.

### 1.3. Abseits des Transkriptionszyklus – Weitere regulatorische Funktionen der CTD

Neben ihrer Funktion im Transkriptionszyklus ist die CTD auch an Prozessen wie dem mRNA-Export beteiligt und beeinflusst die Reaktion der Zelle auf Stress. Um die mRNA ins Zytoplasma zu exportieren, muss diese zu Ribonukleoproteinen (mRNP) verpackt werden. Dies geschieht durch die Assoziation mit dem Heterodimer MEX76/Mtr2 (TAP-p15). Dieses Heterodimer bringt die mRNA zum THO/TREX-Komplex. Der mRNP-Export wird durch Sus1 koordiniert. Sus1 interagiert direkt mit einer Serin5 beziehungsweise Serin2/5 phosphorylierten CTD und verbindet den SAGA-, TREX- und den TREX2-Komplex mit der Kernpore (MacKellar et al., 2011, Pascual-Gracia et al., 2008).

Die CTD hat ebenfalls Einfluss auf die Reaktion der Zelle auf Stress. Rsp5, eine E3-Ubiquitin-Ligase bindet an die CTD als Reaktion auf DNA-Schäden und ubiquitiniert die RNAPII (Beaudenon et al., 1999, Huibregtse et al., 1997). In humanen Fibroblasten führen UV-induzierte DNA-Schäden zur einer Hyperphosphorylierung der CTD durch P-TEFb, was die Ubiquitinierung der RNAPII und ihren anschließenden Abbau zur Folge hat (Heine et al., 2008). Die Serin5-Phosphorylierung der CTD kann ebenfalls die Ubiquitinligase Asr1 rekrutieren, welche die RNAPII-Untereinheiten Rpb1 und Rpb2 ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung führt zur Dissoziation des Heterodimers Rpb4/7 von der RNAPII und inaktiviert diese. Funktional ist dieser Mechanismus noch nicht gut verstanden, dient aber vermutlich dem Abbau arretierter RNAPII (Daulny et al., 2008).

### **1.4. Posttranslationale Modifikationen der CTD**

#### **1.4.1. Serin-Phosphorylierungen**

Die Phosphorylierung der Serine an den Positionen zwei, fünf und sieben in einer Heptad-Wiederholung sind die am besten untersuchten Modifikationen in der CTD. Der Übergang von der CTD-Serin5-Phosphorylierung am 5'Ende zur CTD-Serin2-Phosphorylierung am 3'Ende ist charakteristisch für proteinkodierende Gene. Als wichtige Funktionen der CTD-Serin5-Phosphorylierung sind die Rekrutierung des Capping-Komplexes, die Ablösung der RNAPII vom Promotor und die Rekrutierung von Nrd1 für die 3'Prozessierung und Termination von nicht polyadenylierten Transkripten beschrieben worden (Cho et al., 1997, McCracken et al., 1997, Gudipati et al., 2008, Vasijeva et al., 2008). Serin5 der CTD wird durch CDK7 phosphoryliert (Egloff, 2008).

Die Phosphorylierung von Serin2 wird in der Hefe *S. cerevisiae* durch die Kinasen Bur1 und Ckt1 katalysiert, wobei Ckt1 die aktivere Kinase während der Elongation zu sein scheint (Buratowski et al., 2009, Qiu et al., 2009). Mit Cdk9/Lsk1 besitzt *S. pombe* Homologe zu Bur1/Ckt1 (Viladevall et al., 2009).

In Metazoen phosphoryliert Cdk9 Serin2 der CTD und den Elongationsfaktor Spt5 (Bres et al., 2008). Zusätzlich konnten mit den Ckt1 Orthologen Cdk12 und Cdk13 zwei weitere Serin2-Kinasen identifiziert werden (Blazek et al, 2011, Bartkowiak et al 2010). ChIP-Experimente belegen, dass Cdk12 in transkribierten Regionen von Genen präsent ist. Der Vergleich mit Cdk9 zeigt, dass Cdk12 vor allem in der Mitte

und am 3'Ende von Genen gefunden wird. Knockdown-Experimente von Cdk12 führen zu einer Reduktion der Serin2-Phosphorylierungen (Bartkowiak et al., 2010). Brd4 (*Bromodomain-containing protein 4*) ist eine weitere, atypische Serin2 Kinase und kann zusätzlich durch die Phosphorylierung von P-TEFb die Aktivität von Cdk9 reprimieren (Devaiah et al., 2012). Gleichzeitig kann auch Cdk9 Brd4 phosphorylieren, was deren Kinase-Aktivität verstärkt (Devaiah et al. 2012), wodurch eine präzise Regulation der Serin2-Phosphorylierung ermöglicht wird. Die Serin2-Phosphorylierung der CTD unterliegt somit der Kontrolle verschiedener Kinasen, die sich gegenseitig in ihrer Aktivität kontrollieren.

Die Serin7-Phosphorylierung ist für die Transkription von snRNAs von Bedeutung und war die erste beschriebene CTD-Modifikation mit einer gen-spezifischen Funktion. snRNAs werden weder gespleißt noch polyadenyliert. Sie verfügen über eine 3'Box, die von dem multimeren Integrator-Komplex gebunden wird und für die 3'Prozessierung von snRNAs essentiell ist. Die Phosphatase RPAP2 wird zusammen mit dem Integrator-Komplex über ihre CID an eine CTD-Serin7 phosphorylierte RNAPII rekrutiert und dephosphoryliert Serin5. Durch die anschließende Phosphorylierung von Serin2 durch P-TEFb entstehen Heptade mit einer Serin2/7-Doppelphosphorylierung, die die Assemblierung eines funktionalen Integrators an der 3'Box von snRNAs ermöglicht (Egloff et al., 2012).

Die RNAPII-CTD ist auch bei der Transkription von proteinkodierenden Genen an Serin7 phosphoryliert. Serin7 wird bereits zu Beginn des Transkriptionszyklus phosphoryliert und an der Polyadenylierungsstelle wieder dephosphoryliert. Phosphoryliert wird Serin7 durch Cdk7/Kin28 (Akhtar et al., 2009). Mit Ssu72 teilen sich die Serin5 und -7 CTD-Modifikation auch die Phosphatase (Zhang et al., 2012). Die genaue Funktion der Serin7-Phosphorylierung bei der Transkription von proteinkodierenden Genen ist noch nicht vollständig verstanden.

### **1.4.2. Threonin4-Phosphorylierung**

Das Threonin4 in der CTD wird ebenfalls phosphoryliert. Eine Threonin4/Alanin-Substitution in CTD wird in *S. cerevisiae* (Stiller et al., 2000) sowie in *S. pombe* (Schwer et al., 2011) toleriert, ist aber in höheren Vertebraten letal (Hintermair et al., 2012, Hsin et al., 2011). Genomweite ChIP-Analysen zeigen eine Akkumulation der Threonin4-Phosphorylierung am 3'Ende der Gene, nach der Polyadenylierungsstelle.

Der Aminosäure-Austausch von Threonin4 zu Alanin führt in Säugern zu einem globalen Elongationsdefekt, der sich in der Akkumulation der RNAPII direkt nach der Transkriptionsstartstelle widerspiegelt. Einige Gene werden allerdings auch aktiviert und zeigen eine Anreicherung der RNAPII in der Mitte der Gene (Hintermair et al., 2012).

Eine weitere Studie in Hühner-Zellen mit einer Threonin4/Valin-Mutante beschreibt Defekte bei der Prozessierung von nicht polyadenylierter Histon mRNA, während die Transkription anderer proteinkodierender Gene nicht betroffen ist (Hsin et al., 2011).

In Vertebraten sind bisher zwei Threonin4-Kinasen beschrieben, Plk3 und Cdk9. Es konnte gezeigt werden, dass Plk3 Threonin4 in humanen Zellen phosphoryliert. Die Induktion von Plk3 durch oxidativen Stress hat eine Zunahme der Threonin4-Phosphorylierung zur Folge. Gleichzeitig nimmt die Threonin4-Phosphorylierung mit dem Knockdown von Plk3 ab (Hintermair et al., 2012).

Die Hinweise, dass Cdk9 ebenfalls eine Threonin4-Kinase ist, stützen sich auf Experimente mit den Cdk9 Inhibitoren DRB und Flavopiridol (Hsin et al., 2011). Diese Experimente lassen allerdings offen, inwiefern die Reduktion der Threonin4-Phosphorylierung ein Nebeneffekt durch die gleichzeitige Inhibierung der Serin2-Phosphorylierung ist.

### 1.4.3. Tyrosin1-Phosphorylierung

Tyrosin1 in der CTD ist hoch konserviert und eine Tyrosin1/Phenylalanin (Y1F) Substitution erzeugt einen letalen Phänotyp, was auf eine funktional wichtige Bedeutung dieser Aminosäure hindeutet (West et al., 1995). Die Y1F-Polymerase ist unfähig die hyperphosphorylierte RNAP II<sub>0</sub>-Form auszubilden und führt zur degradierten RNAP II<sub>B</sub>-Form (Descostes et al., 2014). Im Menschen ist c-Abl als Tyrosin1-Kinase beschrieben. C-Abl besitzt in der Hefe kein Homolog und die entsprechende Tyrosin1-Kinase ist in der Hefe derzeit noch nicht bekannt (Baskaran et al., 1999). Die Tyrosin1-Phosphorylierung ist im Menschen als ein Charakteristikum einer promotor-assoziierten RNAPII beschrieben. Polymerasen mit einer Tyrosin1 phosphorylierten CTD erzeugen am Promotor vor allem nicht funktionale *antisense* Transkripte. Weiterhin transkribiert eine Tyrosin1 phosphorylierte RNAPII sogenannte *Enhancer*-Regionen, die außerhalb der Gene

lokalisiert sind und die Expression benachbarter Gene unterstützen (Descotes et al., 2014).

In der Hefe stimuliert die Tyrosin1-Phosphorylierung die Bindung des Elongationsfaktors Spt6 und verhindert andererseits die vorzeitige Rekrutierung von Terminationsfaktoren wie Nrd1, Pcf11 und Rtt103. ChIP-Profile belegen einen Anstieg der Tyrosin1-Phosphorylierung nach der Transkriptionsstartstelle und eine Abnahme vor der Polyadenylierungsstelle in der Hefe (Mayer et al., 2012). Die Dephosphorylierung von Tyrosin1 am 3'Ende der Gene erfolgt in der Hefe durch Glc7, einer Phosphatase-Untereinheit des 3'Prozessierungsfaktors CPF, wodurch eine funktionale Verbindung der 3'Prozessierung von mRNA mit der Transkriptions-Termination entsteht (Schrieck et al., 2014). Zudem wurde kürzlich beschrieben, dass die Serin5-Phosphatase Rtr1 ebenfalls Tyrosin1 dephosphorylieren kann (Hsu et al., 2014).

#### 1.4.4. Prolin-Isomerisierung

Jede Heptad-Wiederholung der CTD enthält an Position drei und sechs jeweils ein Prolin, das in *cis*- oder *trans*-Konfiguration vorliegen kann. Die Prolin-Isomerisierung wird durch Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) katalysiert, in der Hefe durch Ess1 beziehungsweise durch Pin1 in Säugetieren (Egloff et al., 2012). Ess1/Pin1 erkennen ein Aminosäuremotiv mit einem phosphoryliertem Serin/Threonin oberhalb von einem Prolin (Zhang et al., 2012). Der Polyadenylierungs- und Terminationsfaktor Pcf11 bindet ein phosphoryliertes Serin2 oberhalb von einem Prolin in *trans*-Orientierung. Die Serin5-Phosphatase Ssu72 erkennt dagegen ein phosphoryliertes Serin5 mit einem nachfolgendem Prolin6 in *cis*-Konfiguration (Licatalosi et al., 2002, Noble et al., 2005, Werner-Allen et al., 2011). Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Prolin-Isomerisierung von funktionaler Bedeutung ist und das Modifikationsspektrum der CTD weiter erhöht.

#### 1.4.5. Arginin-Methylierung

Im distalen Teil der CTD weichen einzelne Aminosäuren von der Konsensus-Sequenz YSPTSPS ab. Die erste funktional beschriebene Modifikation einer Nicht-Konsensus-Aminosäure ist das Arginin1810 (Arg1810) an Position sieben in der

Heptad-Wiederholung 31. Arg1810 wird in humanen Zellen durch die Methyltransferase CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) methyliert. Die Expression einer Arg1810/Ala-Polymerase wie auch der genetische CARM1 *Knockdown* führen zu einer vermehrten Expression bestimmter snRNAs und snoRNAs und deuten auf eine genspezifische, reprimierende Funktion der Arginin-Methylierung in der CTD hin. *In vivo* ist die Arg1810-Methylierung eine Modifikation der hyperphosphorylierten, transkribierenden RNAPII. Phosphorylierungen an Serin2 und Serin5 in der CTD inhibieren die Arg1810-Methylierungsaktivität von CARM1 *in vitro* und suggerieren, dass das Arginin bereits vor der Transkriptionsinitiation methyliert wird. Der Mechanismus, wie die Arg1810-Methylierung die Expression von kleinen RNAs inhibiert, ist derzeit unbekannt (Sims et al. 2011).

### 1.4.6. Lysin-Acetylierung

In den Nicht-Konsensus-Wiederholungen der CTD ist das Serin an Position sieben in acht Heptad-Wiederholungen durch ein Lysin substituiert und somit der häufigste Aminosäureaustausch. Diese Lysine können *in vivo* durch die Acetyltransferase p300/KAT3B während der Transkription acetyliert werden. ChIP-Seq Analysen belegen, dass die Acetylierung vor allem in der frühen Transkriptionsphase vieler Gene auftritt. Daraus abgeleitet scheint die CTD nach der Transkriptionsinitiation acetyliert zu werden, noch bevor sie hyperphosphoryliert wird. Die Acetylierung des Lysin7 könnte eine inhibitorische Wirkung auf nachfolgende Phosphorylierungen der umliegenden Aminosäuren haben. Auf Grundlage der ChIP-Seq Analysen konnte eine Korrelation zwischen einer RNAPII mit einer stark acetylierten CTD und dem Promotor-proximalen Transkriptionsarrest dargestellt werden. Mutationen der acht Lysine beeinflussen die Transkription von konstitutiv exprimierten Genen (*Housekeeping genes*) nicht. Die Induktion von unmittelbar frühen Genen (*immediate early genes*) wie c-Fos oder Egr2 durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ist hingegen in CTD-Mutanten ohne Lysine reduziert. In Wildtyp-Zellen ist die RNAPII bereits an beiden Genen acetyliert vorhanden und verharrt im Promotor-proximalen Transkriptionsarrest, um nach der Induktion schnell in die produktive Elongation übergehen zu können. Dieser Mechanismus ist in einer Mutante ohne Lysine fehlreguliert und es findet keine Induktion der unmittelbar frühen Gene mehr statt. Somit kommt der Acetylierung der RNAPII-CTD eine wichtige Rolle bei der

Feinabstimmung der Transkriptionsregulation bestimmter Signaltransduktionswege zu (Schröder et al., 2013, Laitem et al., 2013).

### **1.5. Aufgabenstellung**

In den vergangenen Jahren sind die Nicht-Konsensus-Aminosäuren der RNAPII-CTD vermehrt in den Fokus der Wissenschaft gerückt, um zu ergründen, ob sie das Potential besitzen den CTD-Code durch neue Modifikationen zu erweitern. Mit der Beschreibung der Arginin-Methylierung und der Lysin7-Acetylierung sind bereits zwei Modifikation von atypischen CTD-Aminosäuren bekannt (Sims et al., 2011, Schröder et al., 2013). Die Aminosäure Lysin wird bevorzugt posttranslational modifiziert und verfügt über ein großes Modifikationsrepertoire. Lysine können acetyliert, hydroxyliert, ubiquitiniert, neddyliert sowie sumoyliert werden und drei verschiedene Methylierungszustände (Mono-, Di- und Tri-Methylierung) annehmen. In dieser Arbeit sollen die Nicht-Konsensus-Aminosäuren der CTD näher beleuchtet werden, unter der besonderen Berücksichtigung einer möglichen Lysin7-Methylierung der CTD.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Adenosine 5'-Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
$\alpha$ -Amanitin	AppliCem GmbH, Darmstadt
Agarose	Life Technologies, Carlsbad
Ampicillin	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Adenosine 5'-Triphosphate (ATP)	New England Biolabs, Frankfurt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMEM Medium 41966	Life Technologies, Carlsbad
Doxycyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
ECL Advance blocking agent	GE-Healthcare, München
Essigsäure	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Carlsbad
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Glycerol, 86%	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
L-Glutamin 200mM (100x)	Life Technologies, Carlsbad
HEPES	MP Biomedicals Inc., Eschwege

## Material und Methoden

---

His6-Ubiquitin	Boston Biochem, Cambridge, USA
Hygromycin B	Amresco Inc., Ohio, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MG132	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Milchpulver	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biochemicals Inc., Ohio
Neomycin (G 418)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Nonident P40 (NP40)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Penicillin/Streptomycin 10.000U/ml	Life Technologies, Carlsbad
Polyacrylamid 30% (PAA)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
RNasin RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
RPMI Medium 1640	Life Technologies, Carlsbad
T4-DNA-Ligase	Life Technologies, Carlsbad
TEMED	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Tetracyclin	Promega Corp., Wisconsin, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypanblau, 0,4%	Life Technologies, Carlsbad
Trypsin-EDTA, 0,5%	Life Technologies, Carlsbad
Tween 20	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
UBcH5/UBE3D3	Boston Biochem, Cambridge, USA
Ubiquitin Activating Enzyme (UBE1)	Boston Biochem, Cambridge, USA

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Kits

96-Lochplatten	Nunc GmbH, Wiesbaden
6-Lochplatten	Nunc GmbH, Wiesbaden

## Material und Methoden

---

Cryovials 1,5 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
DNA Ladder, 1 kb	Life Technologies, Carlsbad
ECL <sup>TM</sup> -Kit	GE-Healthcare, München
E-Plate 16	ACEA Bioscience, San Diego, USA
Falcon-Reaktionsgefäße 15ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Falcon-Reaktionsgefäße 50ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier GB003	Schleicher&Schuell, Dassel
Hyperfilm ECL	GE-Healthcare, München
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Page Ruler <sup>TM</sup> Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PCR-Purification-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
PhosSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Pipettenspitzen	Gilson, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen, gestopft	MolecularBio-Products, San Diego, USA
Plasmid Mini/Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Polyfect <sup>TM</sup>	Qiagen, Hilden
Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Protein-A-Sepharose-Beads	GE-Healthcare, München
Protein-G-Sepharose-Beads	GE-Healthcare, München
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen 250 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 650 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen (6 cm, 15 cm)	Nunc GmbH, Wiesbaden

### 2.1.3. Geräte

BioRad PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresis Power Supply	PeqLab GmbH, Erlangen
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 54336	Eppendorf AG, Hamburg

## Material und Methoden

---

Flow-Hood-Sicherheitswerkbank	BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	GLW, Würzburg
Gefrierschank -20°C	Siemens AG, München
Gefrierschank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
GS-Gene Linker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hypercassette	GE-Healthcare, München
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Sepatech GmbH, Osterrode
Kühlschrank	Siemens AG, München
M23 Magnetprüher	GLW, Würzburg
Multi-Calimatic pH-Meter	Knick, Berlin
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR, Nebraska, USA
Pipetboy acu	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Pipetman (1000, 200, 20, 10, 2)	Gilson, Wisconsin, USA
SDS-PAGE-Kammer	GE-Healthcare, München
Sonicator	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Stuart Rollermixer SRT 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Telaval 31 Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Thermocycler T Professional	Biometra GmbH u.CoKG, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Vi-CELL™ XR	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
xCELLigence System	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

### 2.1.4. Software

Adobe Photoshop CS 8.0	Adobe Systems, Mountain View, USA
Adobe Reader XI	Adobe Systems, Mountain View, USA
MacVector 12.0.3	MacVector, Inc., Cary, North Carolina, USA
Microsoft Office 2011	Microsoft, Washington, USA
RTCA Software 1.2	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Scaffold 4	Proteome Software, Portland, USA

### 2.1.5. Puffer und Lösungen

ECL-Blocking-Reagenz	PBS-Tween 2% (w/v) ECL-Blocking-Pulver
Entwickler-Lösung (50ml)	3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 25,5 µl Formaldehyd 6 µl (40 mg/ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O) ad H <sub>2</sub> O
Fixierlösung	50% MeOH 12% EtOH 0,5 ml/l Formaldehyd
FLAG-Eluatiions-Puffer	15 µg FLAG-Peptid pro 100 µl PBS
IP-Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1% NP40 Proteaseinhibitoren Phosphataseinhibitoren Optional 10 µM MG132
Kinase-Puffer	50 mM Hepes, pH 7,8 100 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 200 µM EGTA 100 µM EDTA 1 mM DTT 200 µM ATP 1 µg BSA
Lämmli-Puffer (2x)	2% SDS 100 mM DTT 10 mM EDTA

## Material und Methoden

---

	20% Glycerol 60 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,01% Bromphenolblau
Lämmli-Puffer (6x)	9% SDS 375 mM Tris/HCl, pH 6,8 9% $\beta$ -Mercaptoethanol 50% Glycerin 0,06% Bromphenolblau
LB-Medium	1% Casein (Pepton 140) 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl 0,1% Glucose
Lyse-Puffer 1 (LP1)	50 mM Hepes 140 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 10% Glycerol 0,75% NP40 0,25% Triton X-100
Lyse-Puffer 2 (LP2)	200 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 0,5 mM EGTA, pH 8,0 10 mM Tris, pH 8,0 ad H <sub>2</sub> O 1 x Proteaseinhibitor 0,2 mM PMSF 1 $\mu$ g/ml Pepstatin in EtOH
Lyse-Puffer 3 (LP3)	1 mM EDTA, pH 8,0 0,5 mM EGTA, pH 8,0 10 mM Tris, pH 8,0

## Material und Methoden

---

	100 mM NaCl 0,1% Na-Deoxycholate 0,5%N-Laurosylsarcosine ad H <sub>2</sub> O und Inhibitoren s. LP2
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O
PSB-Tween	0,1% (v/v) Tween 20 in PBS
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
TFB1	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 nM RbCl 15% Glycerin der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 5,8 titriert und anschließend steril filtriert
TFB2	10 mM MOPS pH 6,5 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15% Glycerin der pH-Wert wird mit KOH auf pH 6,5 titriert und anschließend steril filtriert
TiO <sub>2</sub> -Ladepuffer	80% Acetonitril 5% Trifluoressigsäure (TFA) 1 M Glycolsäure
TiO <sub>2</sub> -Waschpuffer 1	80% Acetonitril

## Material und Methoden

---

	1% TFA
TiO <sub>2</sub> -Waschpuffer 2	10% Acetonitril 0,2% TFA
TiO <sub>2</sub> -Elutionspuffer	40 µl Ammoniumlösung (28%) In 960 µl H <sub>2</sub> O, pH 11,3
2xTris/SDS pH 8,8	750 mM Tris/HCl 0,2% SDS
2xTris/SDS pH 6,8	250 mM Tris/HCl 0,2% SDS
SDS-PAGE Trenngel (6,5%)	4,3 ml PAA 30% 10 ml 2xTris/SDS pH 8,8 5,5 ml H <sub>2</sub> O 167 µl APS (10%) 17 µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (8%)	5,3 ml PAA 30% 10 ml 2xTris/SDS pH 8,8 4,5 ml H <sub>2</sub> O 167 µl APS (10%) 17 µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (10,5%)	7 ml PAA 30% 10 ml 2xTris/SDS pH 8,8 2,8 ml H <sub>2</sub> O 167 µl APS (10%) 17 µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (15%)	10 ml PAA 30% 10 ml 2xTris/SDS pH 8,8 167 µl APS (10%)

## Material und Methoden

---

	17 µl TEMED
SDS-PAGE Sammelgel (4%)	2 ml PAA 30% 7,5% 2xTris/SDS pH 6,8 5,4 ml H <sub>2</sub> O 90 µl APS (10%) 20µl TEMED
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 0,01% SDS ad H <sub>2</sub> O
Silbernitratlösung (50ml)	100 mg AgNO <sub>3</sub> 37,8 µl 37% Formaldehyd ad H <sub>2</sub> O
Stopp-Lösung	50% MeOH 12% Aceton
50xTAE-Puffer pH 8,0	2M Tris/HCl 5,7% Essigsäure 5 mM EDTA
Ubiquitinierungs-Puffer	25 mM Hepes (pH 7,6) 70 mM KCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,6 mM DTT Proteaseinhibitor ad H <sub>2</sub> O
Western-Blot-Transfer-Puffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 0,01% SDS

0,2% Methanol  
ad H<sub>2</sub>O

Western-Blot Blocking Milch

5% (w/v) Milchpulver in TBS-Tween

### 2.1.6. Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von Frau Dr. Anette Jacob synthetisiert (Peps 4 Life Science, Heidelberg). Die Aminosäuresequenz der Peptide ist bei den jeweiligen Experimenten abgebildet.

### 2.1.7. Antikörper

#### Primärantikörper

Zielprotein	Name	Spezies	Quelle
α-Tubulin	T6199	Maus	Sigma-Aldrich GmbH
Anti-HA-High Affinity	3F10	Ratte	Roche Diagnostics GmbH
unphos. CTD	1C7	Ratte	Hintermair et al. 2012
Tyr1P-CTD	8G9	Ratte	Descostes et al., 2014
Ser2P-CTD	3E10	Ratte	Chapman et al., 2007
Ser5P-CTD	3E8	Ratte	Chapman et al., 2007
Thr4P-CTD	6D7	Ratte	Hintermair et al., 2012
Ser7P-CTD	4E12	Ratte	Chapman et al., 2007
K7me-CTD	1F5	Ratte	E. Kremmer
Rpb1	Pol3.3	Maus	Chapman et al., 2007
Rpb1	N20	Kaninchen	Santa Cruz
Bop1	6H12	Ratte	Hölzel et al., 2005
Nog1	1D8	Ratte	Rohrmoser et al., 2007
Pes1	8E9	Ratte	Hölzel et al., 2005
WWP1	AB10440	Kaninchen	Abcam
FLAG	6F7	Ratte	E. Kremmer
H2B-Ub	7B4	Maus	Prenzel et al., 2011
GST	2C8	Maus	E. Kremmer
GFP	Sc-8334	Kaninchen	Santa Cruz
Pan-Ubiquitin	FK2	Maus	Merck Millipore

Sekundärantikörper

Name	Quelle
Alexa Fluor 680 Goat $\alpha$ -Rat IgG (H+L)	Invitrogen, Karlsruhe
IR Dye 800 CW $\alpha$ -Mouse IgG (H+L)	Rockland Inc, Rockland
$\alpha$ -IgG2b, HRP-gekoppelt (TIB174)	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München
$\alpha$ -IgG Kaninchen, HRP-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg
$\alpha$ -IgG Maus, HRP-gekoppelt	Promega Corp., Wisconsin, USA
$\alpha$ -IgG Ratte, HRP-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg

**2.1.8. Oligonukleotide**

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins synthetisiert und in H<sub>2</sub>O (100  $\mu$ M) gelöst.

Primer zum Klonieren

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> °C
fwd3 WWP1	CCA CCA TGG CCA CTG CTT CAC C	65
rev2 WWP1	TTC TTG TCC AAA TCC CTC TGT CTC TTC	63,4
WW-Del rev	TGT GTT GGC ATT CCC AGA	53,7
WW-Del fwd	GGG AAG TCA TCT GTA ACT AAA	54
HECT-Del rev	TAA TGC CAT AAT CTG TTG GAA G	54,7
HECT-Del fwd	TGT TTT AAT CGC TTG GAT CTA	54,7

Primer zum Sequenzieren

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> °C
CMV-Profor	gestellt von Sequiserve	
912-894	CAT TCA TTG TTT TCT GAG G	51,4
1305-1328	AAA ACC ACT CGC ATC TGA GCC TGC	69,8
2013-2034	GGA TTC AAC AGA CAG GGT TTA C	57,6
2538-2559	GCA GAT AAA TCC AGC ATC AAC C	60,8
wt fwd	CTC CTG CTG ACG CAC CTG TTC T	64
CTD fwd	CCT TTG TCT TTT CCT ATA GGT GGT GC	63,2
CTD rev	GTC AGA CAA CCT CGG TGG CCT GTG TG	69,5

### 2.1.9. Bakterienstamm

Zur Klonierung der RNAPII-CTD- und WWP1-Konstrukte wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH10B verwendet. Der Genotyp dieses Bakterienstamms ist wie folgt beschrieben: F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 araD139  $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK  $\lambda$ - rpsL nupG.

### 2.1.10. Zelllinien

Name	Beschreibung
H1299	humane p53 defiziente Lungenkarzinom Zelllinie
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
Raji	EBV positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie, Suspensionszellen
U2OS	Osteosarkom-Zelllinie, p53 positiv

### 2.1.11. Plasmide

#### RNAPII-CTD-Plasmide

Name	Beschreibung
RX2-287	Zwischen-Vektor zur Klonierung der RNAPII-CTD Mutanten mit Kanamycin-Resistenz. Enthält das letzte Exon der CTD und das $\alpha$ -Amanitin resistente RNAPII Rpb1 Gen.
RX4-267	Tetracyclin-regulierter Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz
RX4-recWT	Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2007. Wildtyp RNAPII mit N-terminalem HA-Tag und $\alpha$ -Amanitin Resistenz
RX4-Con48	Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2007; CTD mit 48 Konsensus-Heptadwiederholungen

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>
RX4-Con48K7	RNAPII CTD mit 48 Konsensus-Heptadwiederholungen und den 8 Wildtyp-Lysinen an Position sieben der Heptadwiederholungen
RX4-recWT-K/S	Wildtyp-RNAPII mit Substitution der 8 Lysine in der CTD zu einem Serin
RX4-YF26	In jeder zweiten Heptad-Wiederholung wurde das Tyrosin1 durch ein Phenylalanin ersetzt (kloniert von Nilay Shah)
RX4-Y2F2	Der distale Teil der CTD trägt eine Tyrosin1-Phenylalanin-Substitution (kloniert von Nilay Shah)
RX4-YF2Y	Der mittlere Teil der CTD trägt eine Tyrosin1-Phenylalanin-Substitution (kloniert von Nilay Shah)

#### **WWP1-Plasmide**

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>
pSfiExpress-Luc	Zwischen-Vektor zur Klonierung der WWP1-Mutanten; trägt eine Kanamycin-Resistenz
pRTS-Luc	kann stabil in Zellen exprimiert werden; trägt ein Ampicillin-Resistenz- und Hygromycin-Resistenz-Gen; Besitzt einen Doxycyclin-induzierbaren bidirektionalen CMV-Promotor, der die Expression von eGFP und einem zweiten Gen kontrolliert (Bornkamm et al., 2005)
pRTS-WWP1	trägt das WWP1-Gen mit C-terminalen FLAG-Tag
pRTS- $\Delta$ WW	trägt das WWP1-Gen mit Deletion der WW-Domäne; C-terminal FLAG-Tag markiert
pRTS- $\Delta$ HECT	trägt das WWP1-Gen mit Deletion der HECT-Domäne; C-terminal FLAG-Tag markiert

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkultur**

#### **2.2.1.1. Kultivierung von Zellen**

##### Adhärente Zellen

Die humanen Zelllinien H1299, HEK293 und U2OS wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 8% CO<sub>2</sub> und 37°C unter sterilen Bedingungen in DMEM-Medium kultiviert. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten wurden die Zellen regelmäßig bei einer Konfluenz von ca. 70-80% gesplittet. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin von den Zellkulturflaschen gelöst. Eine adäquate Menge an trypsinisierten Zellen wurde mit frischem Medium weiterkultiviert.

Das Medium von Zellen, die mit einem pRTS-Vektor transfiziert waren, enthielt zusätzlich Hygromycin (100 µg/ml) zur Selektion. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch die Zugabe von Doxycyclin induziert.

Zusammensetzung DMEM-Medium:

- 10% FCS
- 100 U Penicillin/ml
- 100 µl Streptomycin/ml
- 2 mM L-Glutamin

##### Suspensionszellen

Wildtyp- und stabil transfizierte Raji-B-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre in RPMI-Medium steril kultiviert. Das Medium von transfizierten Raji-Zellen enthielt zusätzlich Neomycin (1 mg/ml) zur Selektion und Tetracyclin (0,1 µg/ml), um die Expression der rekombinanten Proteine zu unterdrücken. Die Zellen wurden alle drei Tage 1:3 mit frischem Medium gesplittet um optimale Wachstumsbedingungen schaffen.

Zur Expression der rekombinanten RNAPII musste das Tetracyclin ausgewaschen werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen (4 min, 1200 rpm) und anschließend vier Mal mit je 25 ml RPMI-Medium gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschsritten wurden die Zellen für 15 min mit dem frischem Medium

inkubiert. 24 h nach der Induktion wurde das Medium zusätzlich mit  $\alpha$ -Amanitin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt, um die endogene RNAPII zu hemmen.

Zusammensetzung RPMI-Medium:

- 10% FCS
- 100 U Penicillin/ml
- 100  $\mu\text{l}$  Streptomycin/ml
- 2 mM L-Glutamin

### 2.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Dafür wurden 40  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension mit dem gleichem Volumen einer 0,5%igem Trypanblau-Lösung (w/v in PBS) vermischt und die Zählkammer damit befüllt. Tote Zellen lassen sich durch ihre blaue Färbung von den lebenden Zellen unterscheiden. Die Zellzahl wurde durch Auszählen von vier Großquadraten bestimmt und mit nachstehender Formel berechnet.

$$c \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \text{Mittelwert Zellzahl} * 10^4$$

### 2.2.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren wurden diese einen Tag vorher gesplittet. Es wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen je Cryoröhrchen eingefroren. Dafür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (4 min, 1200 rpm) und mit 1 ml Einfriermedium (10% DMSO, 90% FCS) resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Cryoröhrchen gefüllt und dieses mit mehreren Lagen Zellstoff umwickelt, um eine langsame Temperaturverringerng zu erreichen. Die Zellen wurden für ca. drei Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, bevor sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen von Zellen wurde das Cryoröhrchen kurz zwischen den Handflächen angewärmt und die Zellen sofort mit 10 ml frischem Medium versetzt. Die Zellen wurden einmal zentrifugiert (1200 rpm, 4 min), um das DMSO zu entfernen und mit dem entsprechendem Medium, mit 20% FCS, resuspendiert.

### **2.2.1.4. Stabile Transfektion von Raji-B-Zellen**

Die stabile Transfektion von Raji-B-Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Für eine Transfektion wurden  $2 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Diese wurden mit PBS gewaschen (1200 rpm, 4 min) und in 500  $\mu$ l kaltem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in eine gekühlte 4 mm Elektroporationsküvette überführt und mit 10  $\mu$ g Plasmid-DNA vermischt. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V und 950  $\mu$ F. Nach der Elektroporation wurde sofort 1 ml FCS in die Küvette pipettiert und die Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen in kleine Zellkulturflaschen mit 5 ml Tetracyclin-Medium (0,1  $\mu$ g/ml) überführt, um die Expression der auf dem Plasmid codierten rekombinanten Polymerase zu unterdrücken.

Zwei Tage nach der Transfektion wurde dem Medium das Selektionsantibiotikum Neomycin (1 mg/ml) hinzugefügt. Die Selektion bedarf in der Regel zwei bis vier Wochen.

### **2.2.1.5. Transfektion von adhärenenten Zellen**

Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale plattiert. Der Transfektionsansatz bestand aus 300  $\mu$ l DMEM-Medium ohne Zusätze, 50  $\mu$ l Polyfect und 8  $\mu$ g DNA. Dieser wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 ml DMEM-Medium mit Zusätzen aufgefüllt. Währenddessen wurden die Zellen mit 8 ml frischem DMEM-Medium versetzt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und diese über Nacht im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und mit Hygromycin-DMEM-Medium (100  $\mu$ g/ml) selektioniert.

### **2.2.2. Messung der Zellproliferation**

Die Messung der Zellproliferation erfolgte mit dem xCELLigence-System. Dafür wurden jeweils 8000 H1299-Zellen, die mit den WWP1-Plasmiden transfiziert und mit Hygromycin selektioniert worden waren in einem Volumen von 150  $\mu$ l DMEM-Medium ausgesät. 24 Stunden nach dem Anwachsen der Zellen wurde die

Expression der rekombinanten Plasmide durch die Zugabe von Doxycyclin induziert und der Einfluss auf die Zellproliferation über 72 Stunden verfolgt.

### **2.2.3. Cisplatin-Stress**

Für den Cisplatin-Stress wurden  $4 \times 10^5$  H1299-Zellen, die mit den WWP1-Plasmiden transfiziert und selektioniert waren in 10 cm Zellkulturschalen plattiert. 24 Stunden nach dem Aussäen wurde die Expression der rekombinanten WWP1-Proteine durch die Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) ins Medium induziert. Nach weiteren 24 Stunden wurde dem Zellkulturmedium Cisplatin (100 µM) zugesetzt und Ganzzelllysate nach sechs und acht Stunden hergestellt.

### **2.2.4. Western-Analyse**

#### **2.2.4.1. Herstellen von Zellextrakten**

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden  $1 \times 10^6$  Zellen 24 h vor der Lyse auf eine 10 cm Zellkulturschale plattiert. Die Zellen wurden zur Lyse mit PBS gewaschen, anschließend mit 250 µl 2 x Lämmli versetzt und mittels Zellschaber von der Zellkulturschale gekratzt. Um die Viskosität der Lysate zu reduzieren wurden diese mit zehn Stößen sonifiziert und 3 min bei 95°C aufgeköcht.

Zur Herstellung von Zellextrakten aus Suspensions- oder trypsinieren -Zellen wurden jeweils  $2,5 \times 10^6$  Zellen ausgezählt, für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert, mit PBS gewaschen (4 min, 1200 rpm) und mit 250 µl 2 x Lämmli lysiert. Die Proben wurden ebenfalls sonifiziert und für 3 min bei 95°C aufgeköcht und bei -20°C gelagert, beziehungsweise direkt auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

#### **2.2.4.2. SDS-PAGE und Western-Blot**

Vor Beladung der SDS-Gele wurden die Proteinextrakte erneut für 2 min bei 95°C gekocht und zentrifugiert (13000 rpm, 3 min). Eine entsprechende Menge der Lysate wurde in die Taschen des SDS-Gels aufgetragen und die Proteine ca. 2 Stunden bei 30 mA pro Gel aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran bei 450 mA für 90 min. Nach dem Transfer wurden die Membranen für eine Stunde mit 5%-Milch-TBS-T bei Raumtemperatur inkubiert. Die

Primärantikörper  $\alpha$ Thr4P,  $\alpha$ K7me und  $\alpha$ Tyr1P wurden mit 2%igem Blocking-Reagenz behandelt und der  $\alpha$ Ubiquitin-Antikörper mit 5%iger BSA-TBS-T-Lösung. Danach wurden die Membranen in ein 50 ml Falcon überführt in dem der Primärantikörper in 5 ml 5%iger Milch-TBS-T verdünnt worden war. Überstandsantikörper wurden 1:10 verdünnt und die kommerziellen Antikörper nach den Angaben der Hersteller. Die Primärantikörper wurden über Nacht bei 4°C auf einem Falcon-Roller inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit 1 x TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper von der Membran zu entfernen und die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Falconroller inkubiert. Die HRP markierten Sekundärantikörper wurden in einem Volumen von 5 ml 5% Milch-TBS-T nach Herstellerangaben verdünnt. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und ein weiteres Mal mit Wasser. Die so vorbereitete Membran wurde in eine Fotokassette gelegt und mit einem 1:1 Gemisch der beiden ECL-Reagenzien überschichtet. Durch Auflegen eines Chemilumineszenz-Films und anschließendem Entwickeln wurden die HRP-Signale sichtbar gemacht. Alternativ wurde die Membran mit fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern behandelt und die Membran mit dem Odyssey-Licor-Gerät eingescannt.

### **2.2.5. Silberfärbung**

Zur Silberfärbung eines denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gels wurde das Gel zunächst für eine Stunde in der Fixier-Lösung leicht geschüttelt, anschließend dreimal für zehn Minuten mit einer 50%igen Ethanol-Lösung gewaschen und eine Minute mit einer 0,2%igen Natriumthiosulfat-Lösung vorbehandelt, die durch zweimaliges, kurzes Waschen mit Wasser wieder entfernt wurde. Darauf folgend wurde das Gel für 20 min mit der Silbernitrat-Lösung inkubiert und diese durch zweimaliges kurzes Waschen mit Wasser entfernt. Durch leichtes Schütteln des Gels in der Entwickler-Lösung wurden die Proteinbanden langsam sichtbar. Wenn die Proteinbanden die gewünschte Intensität aufwiesen, wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit Wasser für zwei Minuten und zehnminütigen Schütteln in der Stopp-Lösung gestoppt. Abschließend wurde das Gel für 20 Minuten mit einer 50%igen MeOH-Lösung behandelt.

## **2.2.6. Massenspektrometrische Methoden**

### **2.2.6.1. Massenspektrometrische Analyse des RNAPII Interaktoms**

Hierfür wurden die HA-markierte RNAPII aus  $1 \times 10^8$  Raji-Extrakten präzipitiert. Dafür wurden 80  $\mu$ l Sepharose G-Beads mit dem HA-Antikörper, sowie den Kontroll-Antikörpern (Pes1, Bop1) gekoppelt und die Zellen in einem Volumen von 10 ml lysiert. Die weiteren Schritte entsprechen dem Protokoll der Immunpräzipitation. Eluiert wurden die Proteine mit 80  $\mu$ l 2 x Lämmli-Puffer bei 95°C für 5 min. Die Proteine wurden auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamid-Gel ca. 2 cm aufgetrennt und das Gel mit EZBlue™ Comassie Brilliant Blue G-250 nach dem Hersteller Protokoll gefärbt. Das Gel wurde nach dem Entfärben mit dem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in 96-Well-Platten mit Wasser überführt.

### **2.2.6.2. Massenspektrometrische Analyse der RNAPII-CTD-Modifikationen**

Für die massenspektrometrische Analyse der posttranslationalen CTD-Modifikationen wurden  $3 \times 10^8$  rec WT-Raji-Zellen eingesetzt und die RNAPII über ihren HA-Tag präzipitiert (Vgl. Abschnitt 2.2.6.1). Die präzipitierten Proteine wurden auf einem 6,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und selektiv die Pol IIA und die Pol II0-Form ausgeschnitten. Nur diese Gelstücke wurden für die massenspektrometrische Analyse weiter aufbereitet.

### **2.2.6.3. Trypsin-Gel-Verdau**

Der Trypsin-Gel-Verdau besteht im Wesentlichen aus vier Schritten, dem Entfärben, der Reduktion, der Alkylierung der Cysteine in den Proteinen und dem abschließenden proteolytischen Verdau mit Trypsin. Hierfür wurde zunächst das Wasser von den Proben entfernt und die Gelstücke zweimal mit 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat (ABC) gewaschen. Im Anschluss wurden die Gelstücke zweimal für 30 Minuten bei 37°C mit einem 1:1 Gemisch aus 20 mM ABC und Acetonitril (ACN) behandelt und anschließend dreimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit ABC gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Gelstücke dreimal für 10 Minuten mit ACN dehydriert und mit einer Mischung aus 10 mM Dithiothreitol (DTT), 20 mM ABC für 60 Minuten reduziert. Anschließend wurden die

Proben im Dunkeln für 30 Minuten mit einer Mischung aus 55mM Iodacetamid (IAA) und 20 mM ABC behandelt, was eine irreversible Alkylierung der –SH Gruppen der Cysteine bewirkt. Im Folgenden wurden die Proben einmal für je 10 Minuten mit 20 mM ABC und dreimal mit ACN gewaschen. Für den Trypsin-Verdau wurde das Enzym (Endkonzentration 10 ng/µl) in 20 mM ABC verdünnt und die Gelstücke damit überschichtet. Die Proben wurden 30 Minuten bei 4°C mit der Trypsin-Lösung inkubiert. Anschließend wurde mit ABC auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und die Gelstücke über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und zusammen mit den Überständen der weiteren Extraktionsschritte auf Eis gesammelt sowie vereinigt. Nachfolgend wurden die Peptide je zweimal für 10 Minuten mit 50% ACN/ 0,25% TFA und ACN extrahiert und die Flüssigkeit auf ein Endvolumen von ca. 5 µl evaporiert.

### **2.2.6.4. Anreicherung von phosphorylierten Peptiden mit Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)**

Die evaporierten Peptide wurden mit 100 µl Ladepuffer versetzt und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10 µl TiO<sub>2</sub>-Beads (Konzentration 30 µg/µl Beads in 100% ACN) hinzugefügt und die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die TiO<sub>2</sub>-Beads binden selektiv die phosphorylierten Peptide. Durch kurzes Zentrifugieren wurden die TiO<sub>2</sub>-Beads pelletiert und der Überstand mit den unphosphorylierten Peptiden abgenommen. Die Beads wurden mit 50 µl Ladepuffer versetzt und 15 Minuten geschüttelt. Im Anschluss wurden die Beads durch kurzes Zentrifugieren wieder pelletiert und der Überstand abgenommen. Nachfolgend wurden die TiO<sub>2</sub>-Beads je einmal mit Waschpuffer 1 und 2 gewaschen und zehn Minuten an der Luft getrocknet. Zum Eluieren der phosphorylierten Peptide wurden die Beads mit 50 µl Elutionspuffer vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Proben durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und der Überstand entnommen. Der Überstand mit den phosphorylierten Peptiden wurde auf ein Volumen von 5 µl evaporiert. Abschließend wurden die Proben mit 30 µl 0,1% Methansäure versetzt und bei -20°C gelagert.

#### **2.2.6.5. Flüssigkeitschromatographie – Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)**

Für die Massenspektrometrie Analyse wurden 13 von 15 µl der Probe (Phosphopeptide: 30 µl) in ein Ultimate 3000 HPLC System (LC Packings) injiziert und in einer C18 Mikro-Säule (300 µm Durchmesser x 5 mm, gestopft mit C18 PepMapTM, 5 µm, 100 Å von LC Packings) entsalzt. Die entsalzten Proben wurden auf einer 15 cm C18 Analyse-Säule (75 µm, gestopft mit ReproSil-Pur C18-AQ 2,4 µm von Dr. Maisch) mit einem 40 Minuten Gradient von 5 bis 60% ACN in 0,1% Methansäure aufgetrennt (Phosphopeptide: Gradient von 5 bis 30% in 60 min und in 10 min von 30 zu 95% ACN). Der Durchfluss von der HPLC wurde direkt mittels Elektronenspray-Ionisation mit dem LTQ-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Einstellungen am Massenspektrometer, sowie die Datenauswertung erfolgt durch Dr. Forne (LMU, München) und sind detailliert in Kellner et al., 2015 aufgelistet.

#### **2.2.7. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Jeweils  $5 \times 10^7$  Raji -Zellen wurden durch die Zugabe der Cosslink-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gecrosslinkt. Durch das Hinzufügen von Glycin (Endkonzentration 250 mM) wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 50 ml kaltem PBS gewaschen (1500 rpm, 4°C, 4 min) und mit 2,5 ml LP1 resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 min bei 4°C auf einem Drehrad lysiert und danach zentrifugiert (1350 g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde mit LP2 resuspendiert und ebenfalls für 20 Minuten bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Erneut wurde die Probe zentrifugiert (1350 g, 5 min, 4°C) und das Präzipitat in LP3 resuspendiert. Das Chromatin wurde nun sonifiziert (14 Zyklen: 30 sek on/off; Amplitude: 40), um eine Fragmentgröße von etwa 250 Basenpaaren zu generieren. Anschließend wurde die Probe mit Triton X-100 (Endkonzentration 1%) versetzt und zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4°C). 50 µl der Probe wurden als Input-Kontrolle abgenommen und die restlichen Extrakte in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese ChIP-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Der Input wurde 1:1 mit 2 x Eluationspuffer versetzt und 13-15 Stunden bei 65°C inkubiert, um den Formaldehyd-Crosslink aufzuheben. Im nächsten Schritt wurde der

Input 1:1 mit TE-Puffer vermischt und für zwei Stunden ein RNaseA-Verdau (Endkonzentration 0,2 µg/ml) durchgeführt. Im Anschluss wurde die Probe zwei Stunden bei 55°C mit Proteinase K (Endkonzentration 0,2 µg/ml) verdaut. Aus dem Input wurde nun die DNA durch zweimalige Phenol-Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) Extraktion gewonnen und mit dem Qiaquick PCR Purification Kit gereinigt. Die DNA wurde auf einem 2%igem Agarosegel hinsichtlich der Fragmentgrößen untersucht.

### ChIP-Seq

Für einen Ansatz wurden 400 µl Protein-G-Dynabeads dreimal mit 1 ml Blocking-Lösung gewaschen und 10 µg des entsprechenden Primärantikörpers über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad gekoppelt. Am nächsten Tag wurden die Beads dreimal mit 1 ml Blocking-Lösung gewaschen um den überschüssigen Antikörper zu entfernen und danach in einem Volumen von 100 µl resuspendiert. Die Beads wurden mit 1,5 ml ChIP-Probe ( $5 \times 10^6$  Zellen) vermischt und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurde der IP-Ansatz achtmal mit 1 ml RIPA-Puffer und einmal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Das präzipitierte Chromatin wurde zweimal von den Beads eluiert. Im ersten Eluationsschritt wurden die Beads für 10 min bei 65°C mit 110 µl Eluationspuffer behandelt und die zweite Eluation mit 100 µl. Beide Eluate wurden anschließend vereinigt und der Crosslink für 13-15 Stunden bei 65°C aufgehoben. Die angeschlossene Anreicherung und Reinigung der DNA erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie für den Input. Zur DNA Analyse wurde ein fünftel der Probe mit dem Bioanalyser 2100 untersucht. Anschließend wurde mit den Proben nach dem Standard-ChIP-Protokoll von Illumina (Illumina GA2x) weitergearbeitet. Die Bearbeitung der Proben und die bioinformatische Auswertung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Andrau in Montpellier.

### **2.2.8. Immunpräzipitation**

Zur Immunpräzipitation von Proteinen wurden 50 µl Sepharose-A- oder Sepharose-G-Beads in Abhängigkeit von dem zu koppelnden Antikörper zweimal mit 750 µl Lysepuffer gewaschen (1200 rpm, 1 min, 4°C). Anschließend wurden die Beads mit 250 µl Überstandsantikörper (Konzentration ca. 200 ng/µl) und 250 µl Lysepuffer für

4 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Von kommerziell erworbenen Antikörpern wurden ebenfalls 5 µg eingesetzt und das Volumen mit Lysepuffer aufgefüllt. Für eine Immunpräzipitation wurden zwischen  $5 \times 10^6$  bis  $7,5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und diese zweimal mit 50 ml kaltem PBS gewaschen (1200 rpm, 4 min). Daraufgehend wurden die Zellen in einem adäquaten Lysepuffer-Volumen (100 µl/1  $\times 10^6$  Zellen) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zweimal mit je 15 Stößen sonifiziert (Output 5, Duty Cycle 50%) und zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4°C). Ein entsprechendes Volumen von  $2 \times 10^5$  Zellen wurde von dem Lysat als Input entnommen und mit 6 x Lämmli-Puffer gekocht (3 min, 95°C). Die mit den Antikörper gekoppelten Beads wurden dreimal mit je 750 µl Lysepuffer gewaschen (1200 rpm, 1 min, 4°C) und mit dem verbliebenen Lysat über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Beads zentrifugiert (1200 rpm, 1 min, 4°C) und ein entsprechendes Volumen von  $2 \times 10^5$  Zellen für eine Überstandskontrolle entnommen. Diese wurde wiederum mit 6 x Lämmli-Puffer versetzt und gekocht (3 min, 95°C). Abschließend wurden die Beads fünfmal mit 750 µl Lysepuffer gewaschen (1200 rpm, 1 min, 4°C) und mit 50 µl Lysepuffer sowie 17 µl 6 x Lämmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden unter Schütteln 4 min, bei 95°C gekocht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.2.9. Proteinanreicherung über den FLAG-Tag**

Zur Proteinanreicherung über den FLAG-Tag wurde zunächst eine Immunpräzipitation (IP) mit einem FLAG-Antikörper für 4 Stunden durchgeführt. Nach dem Waschen der präzipitierten Proteine wurden diese mit 100 µl FLAG-Elutionspuffer (15µg FLAG-Peptid/100µl PBS mit Protaseinhibitoren) durch Schütteln bei 4°C für 30 Minuten eluiert. Im Anschluss wurde die IP eine Minute bei 1500 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand enthält das FLAG-markierte Protein.

### **2.2.10. *In vitro* Ubiquitinierung**

Für die *in vitro* Ubiquitinierung von 2 µg CKT-38-42 Peptid wurde dieses mit 10 mM ATP, 2 µg Ub-His6, 250 ng E2 (UBCh5), 55 ng E1 (UBE1), 5 µg WWP1-FLAG sowie

dem Ubiquitierungs-Puffer für eine Stunde bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 6 x Lämmli-Puffer gestoppt.

### **2.2.11. *In vitro* Phosphorylierung von GST-CTD**

Für die *in vitro* Phosphorylierung wurden 3 µg GST-CTD, Kinase-Puffer und 0,5 µg CDK9 in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das phosphorylierte GST-CTD an Sepharose-Beads über einen GST-Antikörper gekoppelt.

### **2.2.12. Klonierung**

#### **2.2.12.1. Herstellen chemokompetenter *E.coli***

Um die Effizienz der DNA-Plasmid-Aufnahme zu steigern wurden *E. coli* DH10B Bakterien mit divalenten Kationen vorbehandelt. Bakterien wurden in verschiedene Verdünnungen auf LB-Agar-Platten verstrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine 2,5 ml Übernachtskultur mit LB-Medium wurde mit einer einzelnen Kolonie inokuliert, um damit am nächsten Tag eine neue 250 ml Bakterienkultur mit LB-Medium und 20 mM MgSO<sub>4</sub> zu inokulieren. Diese Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 4500 x g, 4°C, für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 100 ml eiskaltem Puffer TFB1 resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurden die Bakterien erneut pelletiert (4500 x g, 4°C, 5 min). Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskaltem Puffer TFB2 vorsichtig resuspendiert und in 50 – 100 µl Aliquotes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquotes wurden bei -80°C gelagert.

#### **2.2.12.2. Transformation von *E.coli***

Zur Produktion von großen Mengen Plasmid-DNA wurde der *E.coli* Stamm DH10B mit 1 ng – 1 µg Plasmid-DNA beziehungsweise 10 µl Ligationsansatz transfiziert. Die Bakterien wurden für ca. 10 min auf Eis angetaut und mit der DNA versetzt. Anschließend wurden die Bakterien weitere 20 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden. Die Bakterien wurden danach für 2

min auf Eis inkubiert, mit 200 µl LB-Medium versetzt und anschließend für 45 min, bei 37°C geschüttelt, um das Resistenzgen zu exprimieren. Von der Bakteriensuspension wurden zwischen 50 – 200 µl auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum verstrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.12.3. Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxiprep)

Zur Isolation kleiner Plasmidmengen wurde eine *Miniprep* mit den Lösungen des Plasmid-Maxi-Kits von Qiagen durchgeführt. Dafür wurden einzelne *E. coli* DH10B Kolonien in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1 ml der Bakteriensuspension wurde bei 3000 rpm, 4°C für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und anschließend mit 200 µl Puffer P2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Daraufhin wurde 200 µl des Neutralisationspuffers P3 hinzugefügt und die *Miniprep* zentrifugiert (10 min, 4°C, 14000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Durch erneutes Zentrifugieren der *Miniprep* für 30 min, 4°C bei 14000 rpm wurde die Plasmid-DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igen eiskaltem Ethanol gewaschen (10 min, 4°C, 14000 rpm). Abschließend wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Präzipitat für mehrere Minuten an der Luft getrocknet bevor es mit 50 µl TE-Puffer resuspendiert wurde.

Für die *Maxi-Prep* wurde das *Qiagen Plasmid-Maxi-Kit* verwendet. Dafür wurde eine 400 ml Übernachtskultur mit Selektionsantibiotikum angesetzt. Die weitere Plasmidisolierung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des *Qiagen-Maxi-Kits*.

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

#### **2.2.12.4. Restriktionsverdau**

Restriktionsverdau wurden zum Öffnen von Klonierungsvektoren und zur Kontrolle von neu klonierten Vektoren durchgeführt. Die jeweiligen Restriktionsenzyme wurden nach den Vorgaben der Hersteller eingesetzt.

#### **2.2.12.5. DNA-Ligation**

Die Ligation von kompatiblen DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA-Ligase. Dafür wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt und die Ligation nach Angaben des Herstellers über Nacht bei 16°C durchgeführt.

#### **2.2.12.6. DNA Agarose-Gel-Elektrophorese und DNA-Gelextraktion**

Plasmid-DNA wurde nach Restriktionsverdau auf einem Agarosegel (0,7-1,5%, mit 2,5 µg/ml EtBr) aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, mit EtBr versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die DNA wurde im Verhältnis 1:6 mit 6 x Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde die DNA in TAE-Laufpuffer für 1 – 2 h bei 100 V aufgetrennt. Für Klonierungen wurden entsprechende DNA-Banden auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* nach dem Herstellerprotokoll gereinigt.

#### **2.2.12.7. RNA-Extraktion**

Zur RNA-Extraktion wurden  $1 \times 10^7$  Raji-Zellen bzw.  $5 \times 10^6$  U2OS Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen (1400 rpm, 4 min) und die RNA mit dem *Qiagen RNeasy Mini Kit* extrahiert. Dafür wurden die Zellen mit 600 µl RLT Puffer lysiert und mit den *QIAshredder* Säulen homogenisiert. Die weiteren Schritte der RNA Extraktion erfolgten nach dem Herstellerprotokoll. Zusätzlich wurde der vom Hersteller empfohlene DNase-Verdau durchgeführt. Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration mit dem Nano Drop bestimmt.

### 2.2.12.8. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit 4 µg Gesamt-RNA und Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primern. Verwendet wurde das Protokoll der *SuperScript II* Reverse Transcriptase von Invitrogen.

### 2.2.12.9. Klonieren von WWP1 aus cDNA

WWP1 wurde aus U2OS cDNA mit Hilfe von spezifischen Primern (s. Abschnitt 2.1.8.) amplifiziert und kloniert. Dem *forward* Primer wurde zusätzlich eine Kosak-Sequenz an das 5' Ende angefügt.

PCR-Ansatz	Volumen
cDNA	2 µl
Kapa-Hifi-DNA-Polymerase	1 µl
Kapa-Hifi-Puffer (5x)	10 µl
dNTP's (10 mM)	1,5 µl
Primer (fwd, rev), (10 µM)	je 1,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### PCR-Zyklus

Denaturieren	95°C	2 min	
Denaturieren	98°C	20 sec	} 25 x
Primer Annealing	55-65°C	15 sec	
Verlängerung	72°C	3 min	
Finale Verlängerung	72°C	10 min	
Kühlen	4°C	∞	

Die DNA wurde nach der PCR auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, das PCR-Produkt ausgeschnitten und extrahiert.

### **2.2.12.10. Klonierung in pSfiExpress- und pRTS-Vektoren**

Das amplifizierte WWP1-Gen wurde in den pSfi-Express-Vektor kloniert, um dem Gen C-terminal ein FLAG-Tag anzufügen. Dafür wurde der pSfi-Express-Vektor mit EcoRV geöffnet und anschließend dephosphoryliert. Daraufhin wurde das WWP1-Gen in den Vektor ligiert und in *E.coli* transformiert. Das Plasmid wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Zur stabilen und induzierbaren Expression des WWP1-Gens in humanen Zellen wurde das Gen in den pRTS-Expressionsvektor kloniert. Hierzu wurde das WWP1-Gen flankiert durch zwei Sfi-Schnittstellen aus dem pSfi-Express-WWP1-Vektor geschnitten und in den durch Sfi-Restriktionsverdau geöffneten pRTS-Vektor ligiert. Der Vektor wurde in *E.coli* transformiert und erneut durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Der pRTS-Vektor besitzt zur Selektion in Bakterien eine Ampicillin-Resistenz und ein Hygromycin-Gen zur Selektion in humanen Zellen. Durch Doxycyclin kann der bidirektionale CMV-Promotor induziert werden. Unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehen sowohl das eGFP- (*enhanced green fluorescent protein*) (Bornkamm et al., 2005) als auch das WWP1-Gen.

### **2.2.12.11. PCR-Mutagenese**

Die Deletion der WW- und HECT-Domäne des WWP1-Gens erfolgte auf Grundlage des pSfi-Express-WWP1-Plasmids mittels PCR-Mutagenese. Die Aminosäuren 349-529 wurden bei der WW-Mutante deletiert und bei der HECT-Mutante die Aminosäuren 588-922. Für die PCR wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt und die jeweiligen Primer aus Abschnitt 2.1.8. verwendet.

PCR-Zyklus

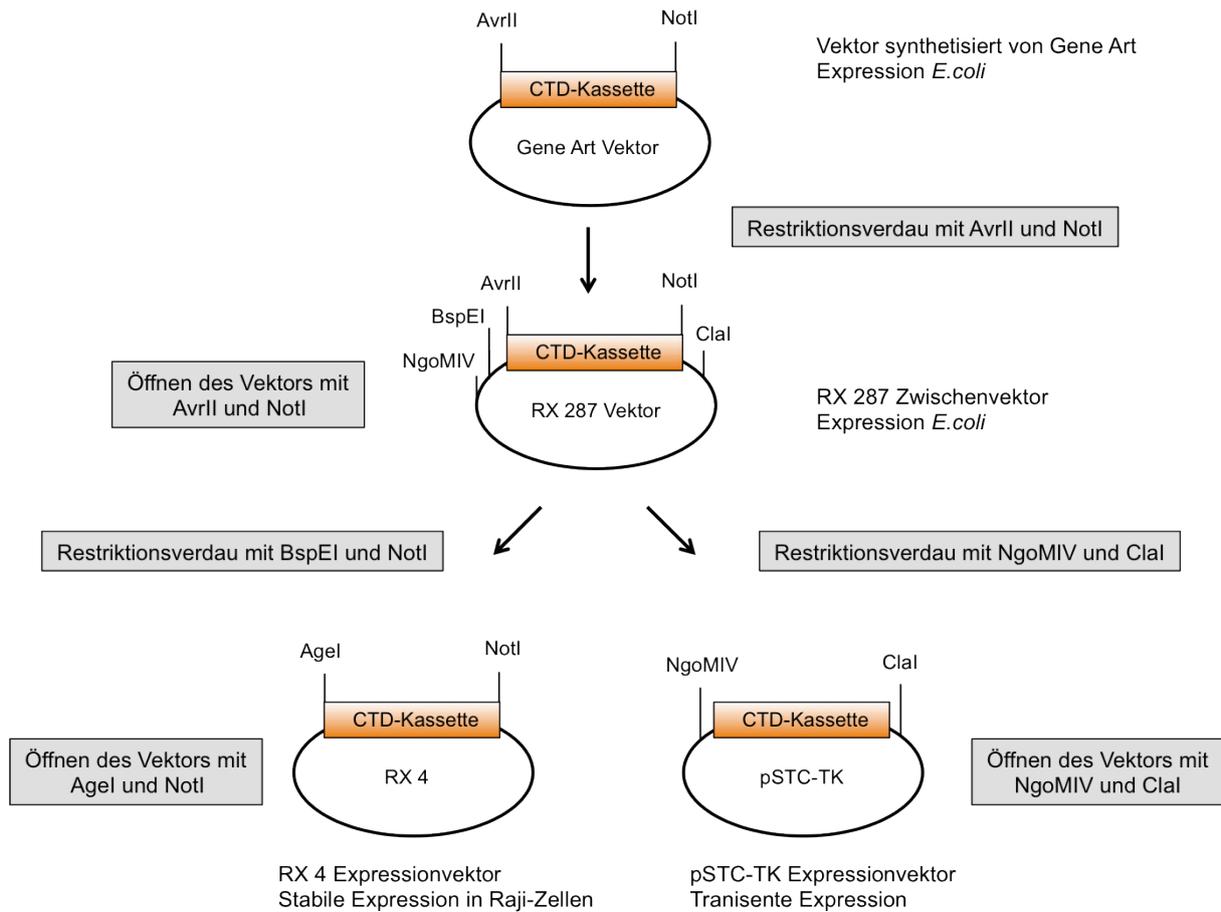
Denaturieren	95°C	2 min	
Denaturieren	98°C	20 sec	} 25 x
Primer Annealing	48-60°C	15 sec	
Verlängerung	72°C	5 min	
Finale Verlängerung	72°C	10 min	
Kühlen	4°C	∞	

Die DNA wurde nach der PCR auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA aus dem Agarose-Gel extrahiert, ligiert und in *E.coli* transformiert. Mittels Restriktionsverdau wurden korrekte Plasmide identifiziert und die Plasmide durch Sequenzierung überprüft. Abschließend wurde das mutierte WWP1-Gen in den pRTS-Expressionsvektor kloniert.

**2.2.12.12. Klonierung der RNAPII-CTD-Mutanten**

Zur Klonierung von RNAPII-CTD-Mutanten wurden die entsprechenden CTD-Sequenzen von Gene Art synthetisiert. Die CTD-Kassette ist durch die Restriktionsschnittstellen AvrII und NotI flankiert, wodurch das Fragment herausgeschnitten werden kann, ohne den Leserahmen zu ändern. Die CTD-Kassette wird zunächst in den Zwischenvektor RX 287 kloniert, um das CTD-Fragment mit den neuen Restriktionsschnittstellen BspBI und NotI in den Expressionsvektor RX4 zu ligieren. Der RX4 Vektor wird mit den Restriktionsenzymen AgeI und NotI geöffnet. Der RX4-Expressionvektor ermöglicht eine Tetracyclin-regulierte Expression der Rpb1-CTD-Kassette (Abb. 5). Zur transienten Expression der rekombinanten Polymerasen wurde die CTD-Kassette zusätzlich in den pSTC-TK Expressionsvektor kloniert. Hierfür wurde der Zwischenvektor RX 287 und der pSTC-TK-Vektor mit NgoMIV und ClaI verdaut.

## Material und Methoden



**Abbildung 5: Klonierung der RNAPII-CTD-Mutanten.** Schematische Darstellung der einzelnen Klonierungsschritte. Der Gene Art-Vektor und der Zwischenvektor RX 287 wurden beide mit AvrII und NotI geschnitten und die CTD-Kassette in den RX 287 Vektor ligiert. Zur Klonierung in den Expressionsvektor RX 4-Vektor wurde dieser mit AgeI und NotI geöffnet und die CTD-Kassette durch Restriktionsverdau mit BspEI und NotI aus dem Zwischenvektor geschnitten. Um die CTD-Kassette in den pSTC-TK-Vektor zu klonieren wurden der Vektor und das Insert mit NgoMIV und Clal geschnitten. Klonierungsstrategie nach Chapman et al., 2005.

### 3. Ergebnisse

Die carboxy-terminale Domäne (CTD) der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (RNAPII) besteht aus 52 Heptad-Wiederholungen und kann in zwei Abschnitte untergliedert werden, der proximalen und der distalen CTD. Der proximale Teil enthält vornehmlich Heptade mit der Konsensus-Sequenz Tyrosin1-Serin2-Prolin3-Threonin4-Serin5-Prolin6-Serin7. Charakteristisch für den distalen Bereich der CTD sind Heptade mit Abweichungen von der Konsensus-Sequenz. Besonders Serin7 der distalen Heptade ist wenig konserviert und häufig durch die Aminosäure Lysin ersetzt. Während des Transkriptionszyklus werden die Heptade der CTD reversibel phosphoryliert. Wenig ist allerdings über die anderen Modifikationen der CTD bekannt. Beschrieben wurden bisher lediglich die Methylierung des Arginin1810 und die Lysin7-Acetylierung der CTD. Im Fokus dieser Arbeit sollen vor allem weitere posttranslationale Modifikationen des Lysin7 stehen.

#### 3.1. Charakterisierung des 1F5 Antikörpers *in vitro*

Um die Modifikation bestimmter Aminosäuren in der CTD zu untersuchen, kommt der Erzeugung und Charakterisierung von modifikationsspezifischen, monoklonalen Antikörpern eine besondere Bedeutung zu. So wurden in unserem Labor bereits Antikörper gegen die fünf potentiellen Phosphorylierungsstellen in einer CTD-Heptad-Wiederholung etabliert (Chapman et al., 2007, Akhtar et al., 2009, Hintermair et al., 2012, Descostes et al., 2014).

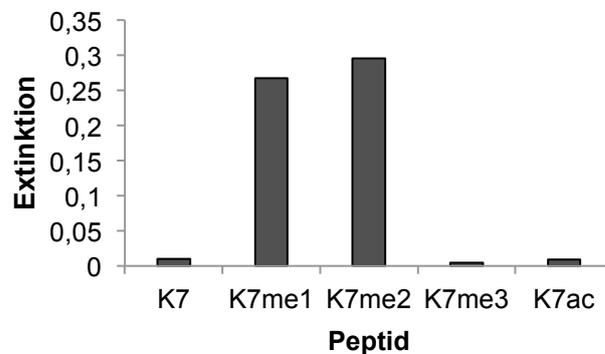
Bei der Auswahl der zur Immunisierung verwendeten Peptide galt es zu beachten, dass die benachbarten Aminosäuren des CTD-Lysin7 in den Heptaden 35, 42 und 49 von der Konsensussequenz abweichen. Somit kann ein Antikörper, der mit den verwendeten Peptiden erzeugt wurde, vermutlich nicht alle acht Lysine der CTD erkennen.

Die generierten Hybridom-Überstände wurden in ELISA-Experimenten auf verschiedenen Di-Heptapeptiden mit unterschiedlichen Lysin7-Modifikationen hinsichtlich ihrer Reaktivität getestet (Abb. 6 A). Der 1F5-Antikörper zeigt im ELISA eine spezifische Reaktivität gegen das mono- und di-methylierte Peptid. Unmodifizierte, tri-methylierte und acetylierte Peptide werden von diesem Antikörper nicht erkannt (Abb. 6 B).

**A**

Peptid	Sequenz
K7	Y S P T S P K Y S P T S P K C
K7me1	Y S P T S P <b>Kme1</b> Y S P T S P K C
K7me2	Y S P T S P <b>Kme2</b> Y S P T S P K C
K7me3	Y S P T S P <b>Kme3</b> Y S P T S P K C
K7ac	Y S P T S P <b>Kac</b> Y S P T S P K C

**B**



**Abbildung 6: Reaktivität des 1F5-Antikörpers.** A) Die spezifische Reaktivität des monoklonalen 1F5-Antikörpers wurde mit den dargestellten Peptiden mittels ELISA überprüft. Die modifizierten Aminosäuren der Di-Heptapeptide sind rot unterlegt und tragen C-terminal ein Cystein, um die Peptide für ELISA-Experimente an Maleimid zu koppeln. B) Dargestellt ist die Bindung des 1F5-Antikörpers an die Peptide im ELISA. Die Bindung wird anhand einer Farbreaktion gemessen und ist im Diagramm dargestellt.

Da der 1F5-Antikörper eine Spezifität für mono- und di-methylierte CTD-Peptide zeigt, wurde anhand von Verdünnungsexperimenten weiterführend untersucht, ob der Antikörper eine Präferenz für eine der beiden Modifikationen besitzt. Dazu wurden CTD-Peptide mit unterschiedlichen Methylierungszuständen als Antigen in ELISA-Experimenten eingesetzt (Abb. 7 A). Die Peptide wurden schrittweise verdünnt und die Reaktivität des 1F5-Antikörpers mittels ELISA analysiert. Abbildung 7 B zeigt eine deutlich stärkere Reaktivität des 1F5-Antikörpers gegenüber dem di-methylierten Peptid im Vergleich zum mono-methylierten Peptid. Eine 1:320 Verdünnung des Antigens reduziert die Reaktivität des 1F5-Antikörpers für die Mono-Methylierung um > 10-fach und für die Di-Methylierung < 2-fach.

Während des Transkriptionszyklus werden die CTD-Heptade reversibel durch Phosphorylierungen modifiziert. Die Kenntnis möglicher inhibitorischer Effekte von

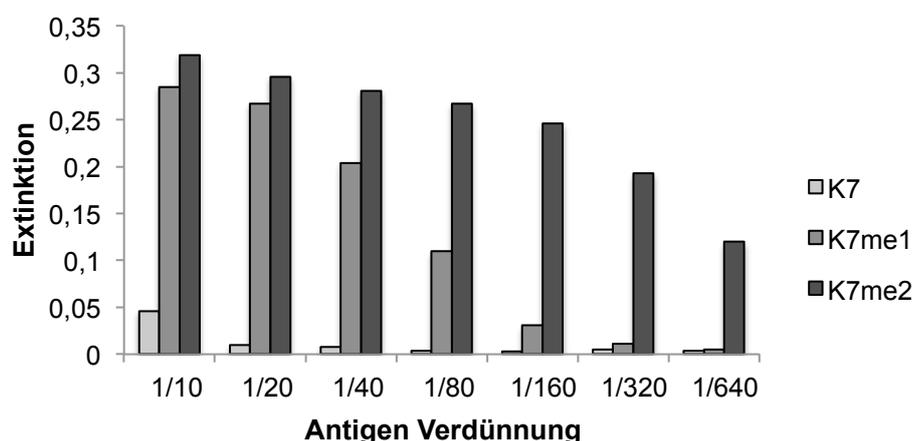
## Ergebnisse

CTD-Phosphorylierungen auf die Reaktivität des 1F5-Antikörpers ist daher wichtig. CTD-Peptide, die neben der Lysin-Methylierung eine benachbarte Phosphorylierung an Serin2 oder Serin5 besitzen, wurden in ELISA-Experimenten auf ihre 1F5-Antikörperreaktivität getestet (Abb. 8 A).

**A**

Peptid	Sequenz
K7	Y S P T S P K Y S P T S P K C
K7me1	Y S P T S P <b>Kme1</b> Y S P T S P K C
K7me2	Y S P T S P <b>Kme2</b> Y S P T S P K C

**B**



**Abbildung 7: Verdünnungskinetik des Antigens.** A) Dargestellt sind die verwendeten Peptide für die Verdünnungskinetik. Modifikationen der Aminosäuren sind rot unterlegt. B) ELISA-Ausgangskonzentration des Antigens 1 mg/ml. Die Extinktion als Maß für die spezifische Bindung des 1F5-Antikörpers ist im Diagramm für die verschiedenen Verdünnungen dargestellt.

Das Säulendiagramm und die daraus abgeleitete schematische Darstellung zeigen, dass eine benachbarte Serin5-Phosphorylierung die Reaktivität des 1F5-Antikörpers inhibiert, während eine Serin2-Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Epitoperkennung hat (Abb. 8 B, C).

Die Charakterisierung des 1F5-Antikörpers verdeutlicht die Komplexität der Epitoperkennung durch einen Antikörper. Von besonderer Bedeutung für die Interpretation von *in vivo* Experimenten ist die Kenntnis von inhibitorischen Modifikationen in einem CTD-Heptad. Ein negatives Ergebnis für die Bindung eines Antikörpers bedeutet nicht immer, dass die entsprechende Modifikation nicht

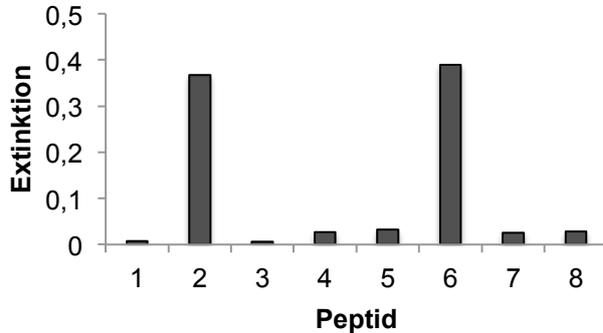
## Ergebnisse

vorhanden ist. Es ist durchaus möglich, dass benachbarte Modifikationen die Epitoperkennung behindern.

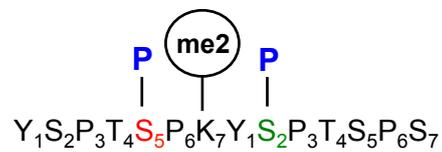
### A

Peptid	Sequenz	Modifikation
1	T S P S Y S P T S P K Y S P T S P S-PEG-Biotin	
2	T S P S Y S P T S P <b>Kme2</b> Y S P T S P S-PEG-Biotin	Kme2
3	T S P S Y S P T <b>Sp</b> P K Y S P T S P S-PEG-Biotin	Ser5P
4	T S P S Y S P T <b>Sp</b> P <b>Kme2</b> Y S P T S P S-PEG-Biotin	Ser5P, Kme2
5	T S P S Y S P T S P K Y <b>Sp</b> P T S P S-PEG-Biotin	Ser2P
6	T S P S Y S P T S P <b>Kme2</b> Y <b>Sp</b> P T S P S-PEG-Biotin	Ser2P, Kme2
7	T S P S Y S P T <b>Sp</b> P K Y <b>Sp</b> P T S P S-PEG-Biotin	Ser2/5P
8	T S P S Y S P T <b>Sp</b> P <b>Kme2</b> Y <b>Sp</b> P T S P S-PEG-Biotin	Kme2, Ser2/5P

### B



### C



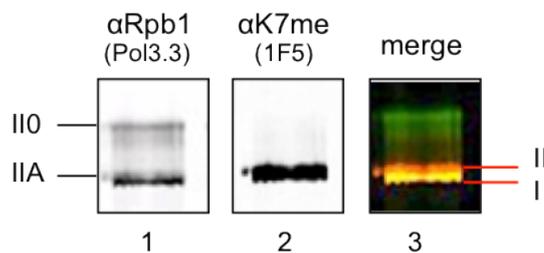
**Abbildung 8: Einfluss benachbarter Aminosäuremodifikationen auf die Epitoperkennung des 1F5-Antikörpers.** A) Dargestellt sind die im ELISA verwendeten Peptide. Modifikationen des Lysins sind rot unterlegt und Phosphorylierungen der Serine blau. Die Peptide sind C-terminal an Biotin gekoppelt. B) Spezifische Reaktivität des 1F5-Antikörpers für die CTD-Peptide im ELISA. C) Schematische Darstellung des 1F5-Erkennungsmotivs. Phosphorylierungen rot markierter Aminosäuren hemmen die Antikörperbindung, während grün markierte Aminosäuren die Bindung nicht beeinflussen.

### 3.2. Charakterisierung des 1F5 Antikörpers für zelluläre Epitope

Nachdem der 1F5-Antikörper umfangreich *in vitro* mittels ELISA analysiert worden ist, wurde die Charakterisierung für zelluläre Epitope fortgesetzt.

### 3.2.1. Die CTD-Lysin7-Methylierung in zellulären-Extrakten

Die Reaktivität des 1F5-Antikörpers wurde mittels Western-Analyse in Raji-Zellextrakten untersucht (Abb. 9). Zusätzlich wurde der Antikörper Pol3.3 ( $\alpha$ -Rpb1) als Kontrolle verwendet. Dieser Antikörper erkennt die große Untereinheit (Rpb1) der RNAPII an einem konservierten Epitop außerhalb der CTD und zeigt in Western-Analysen zwei distinkte Banden für die sogenannte hypophosphorylierte RNAP IIA-Form und die hyperphosphorylierte RNAPII II0-Form (Abb. 9, Spur 1).



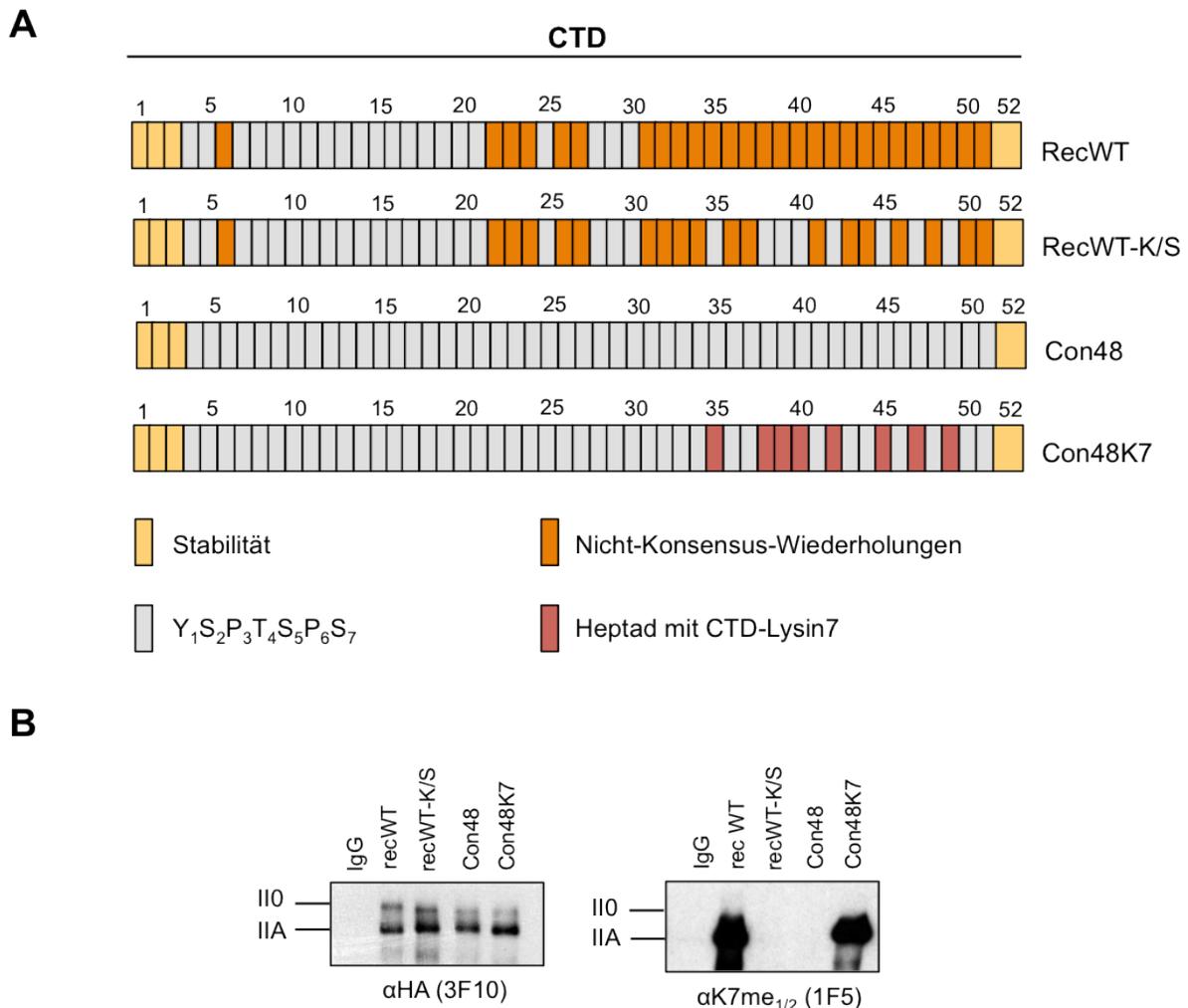
**Abbildung 9: Der 1F5-Antikörper erkennt die IIA-Form von RNAPII.** Raji-Zellextrakte wurden mittels Western-Analyse auf ihre CTD-Lysin-7-Methylierung mit dem Odyssey-System untersucht. Spur 1 zeigt die Pol3.3-Kontrolle im 800 nm Kanal, Spur 2 die Lysin7 Methylierung (1F5) im 680 nm Kanal und Spur 3 die Überlagerung beider Farbkanäle (merge).

Der 1F5-Antikörper zeigt ausschließlich eine spezifische Reaktivität für die schneller im Polyacrylamid-Gel wandernde, hypophosphorylierte RNAP IIA-Form. Durch die Analyse des Western-Blots mit dem Odyssey System ist es möglich die farblich verschiedenen Fluoreszenzsignale des Pol3.3 und des 1F5-Antikörper zu überlagern. Dabei wird deutlich, dass der 1F5-Antikörper innerhalb der RNAP IIA-Form unterschiedliche Intensitäten aufweist. Eine schwache Reaktivität ist durch die gelbe Farbe im unteren Bereich der RNAP IIA-Form zu erkennen (Abb. 9, I). Darüber zeichnet sich eine rote Bande mit einer stark methylierten RNAPII-Fraktion ab. Diese Polymerase-Form migriert etwas langsamer in der SDS-PAGE (Abb. 9, II).

Die Western-Blot Analyse bestätigt zum einem die *in vitro* beobachtete spezifische Reaktivität des 1F5-Antikörpers und zeigt, dass Lysin7 in der CTD auch in der Zelle methyliert wird. Somit ist dieser Antikörper ein hervorragendes Mittel, um diese CTD-Modifikation mit weiterführenden molekularbiologischen Methoden zu untersuchen.

### 3.2.2. Untersuchung von CTD-Mutanten mit dem 1F5-Antikörper

Um die Spezifität des 1F5-Antikörpers zu überprüfen sind rekombinante Polymerasen mit Aminosäure-Substitutionen in den Heptad-Wiederholungen ein ideales Mittel.



**Abbildung 10: Die Reaktivität des 1F5-Antikörpers in CTD-Lysin7-Mutanten.** A) Schematische Darstellung verschiedener CTD-K7-Konstrukte. Alle Rpb1-CTD-Mutanten enthalten die Nicht-Konsensus-Wiederholungen eins bis drei, sowie 52, da diese für die Stabilität wichtig sind. Die Zusammensetzung der CTD-Wiederholungen entspricht dem abgebildeten Farbschema. B) Expression der CTD-Mutanten in HEK293-Zellen für 48 h und anschließender  $\alpha$ -Amanitin-Behandlung für 24 h. Die HA-getaggten CTD-Mutanten wurden über den HA-Tag aus Zellextrakten präzipitiert und mittels Western-Analyse untersucht.

Das hierfür verwendete transiente Expressionssystem basiert auf rekombinanten Polymerasen die eine Punktmutation in der großen Untereinheit Rpb1 besitzen und deshalb gegen den RNAPII-Inhibitor  $\alpha$ -Amanitin resistent sind (Bartolomai und Corden, 1987).  $\alpha$ -Amanitin ist das Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*

und führt zur Hemmung sowie Abbau der endogenen RNAPII, während die rekombinanten Polymerasen in ihrer Aktivität und Stabilität nicht beeinflusst werden (Meininghaus et al., 2000). Zusätzlich besitzt die rekombinante Rpb1-Untereinheit N-terminal einen HA-Tag.

Die CTDs der rekombinanten Rpb1-Mutanten sind in Abbildung 10 A schematisch abgebildet. Alle CTD-Konstrukte besitzen die ersten drei und die letzte Wildtyp-Wiederholungseinheit für die Stabilität der Polymerase in der Zelle (Chapman et al., 2005). Der rekombinante Wildtyp (recWT) dient als Kontrolle. In RecWT-K/S sind die acht Lysine der CTD durch ein Serin ersetzt. Con48 besteht aus 48 Konsensus-Wiederholungen und besitzt damit keine Lysine in der CTD. Con48-K7 enthält acht Lysin-Reste an den selben Positionen wie die Wildtyp-Polymerase (Abb. 10 A).

Die CTD-Konstrukte wurden in HEK293-Zellen exprimiert, da diese eine hervorragende Transfektionseffizienz aufweisen. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt. Anschließend wurden die rekombinanten Polymerasen aus Zellextrakten über ihren HA-Tag präzipitiert. Die Western-Blot-Analyse mit dem HA-Antikörper zeigt, dass alle Polymerasen gleichmäßig präzipitiert wurden. Der 1F5-Antikörper reagiert mit dem rekombinanten Wildtyp und mit Con48-K7. Con48 und recWT-K/S, die kein Lysin in der CTD enthalten werden vom 1F5-Antikörper nicht erkannt (Abb. 10 B). Dieses Experiment verdeutlicht, dass die Reaktivität des 1F5-Antikörper von Lysinen in den CTD-Heptaden abhängig ist.

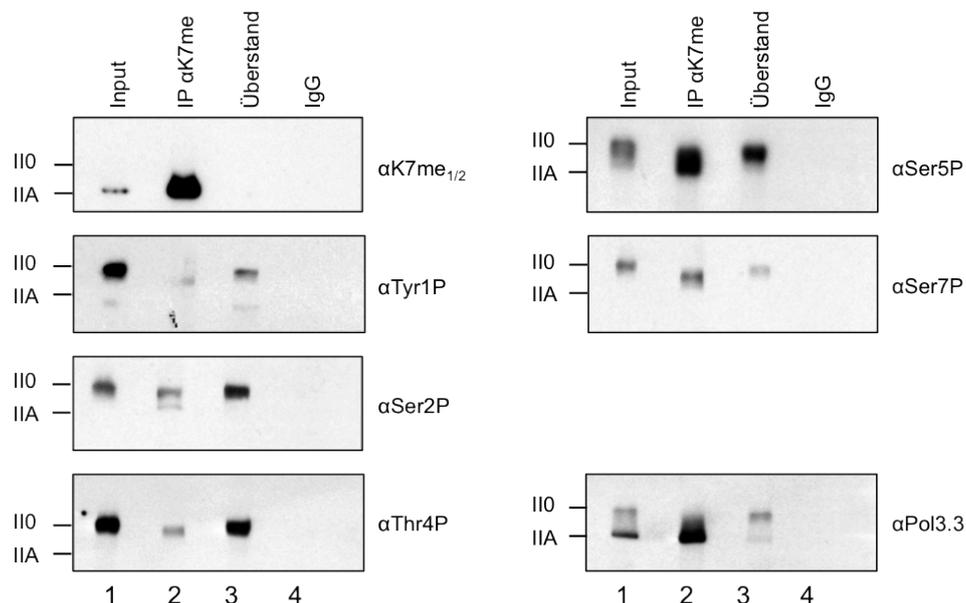
### **3.2.3. Das Auftreten der Lysin7-Methylierung mit anderen CTD-Modifikationen**

Die nächste wichtige Frage ist, ob die Lysin7-Methylierung in allen Formen der RNAPII auftritt, oder ob nicht phosphorylierte, oder bestimmte phosphorylierte Formen bevorzugt methyliert werden. Für diese Untersuchung standen phosphospezifische Antikörper zur Verfügung, die die CTD erkennen, wenn sie an Tyrosin1, Serin2, Threonin4, Serin5 oder Serin7 phosphoryliert ist.

Für die Analyse wurden Immunpräzipitationen (IPs) mit dem 1F5-Antikörper aus H1299-Zellextrakten durchgeführt. Die Präzipitate wurden mittels Western-Analyse auf die gleichzeitige Präsenz weiterer CTD-Modifikationen untersucht. Um die Effizienz der IP bewerten zu können, wurde jeweils eine Überstandskontrolle

## Ergebnisse

mitgeführt. CTD-Lysin7 methylierte Polymerasen werden durch den 1F5-Antikörper quantitativ präzipitiert, da keine Reaktivität im Überstand verbleibt (Abb. 11, Spur 3).



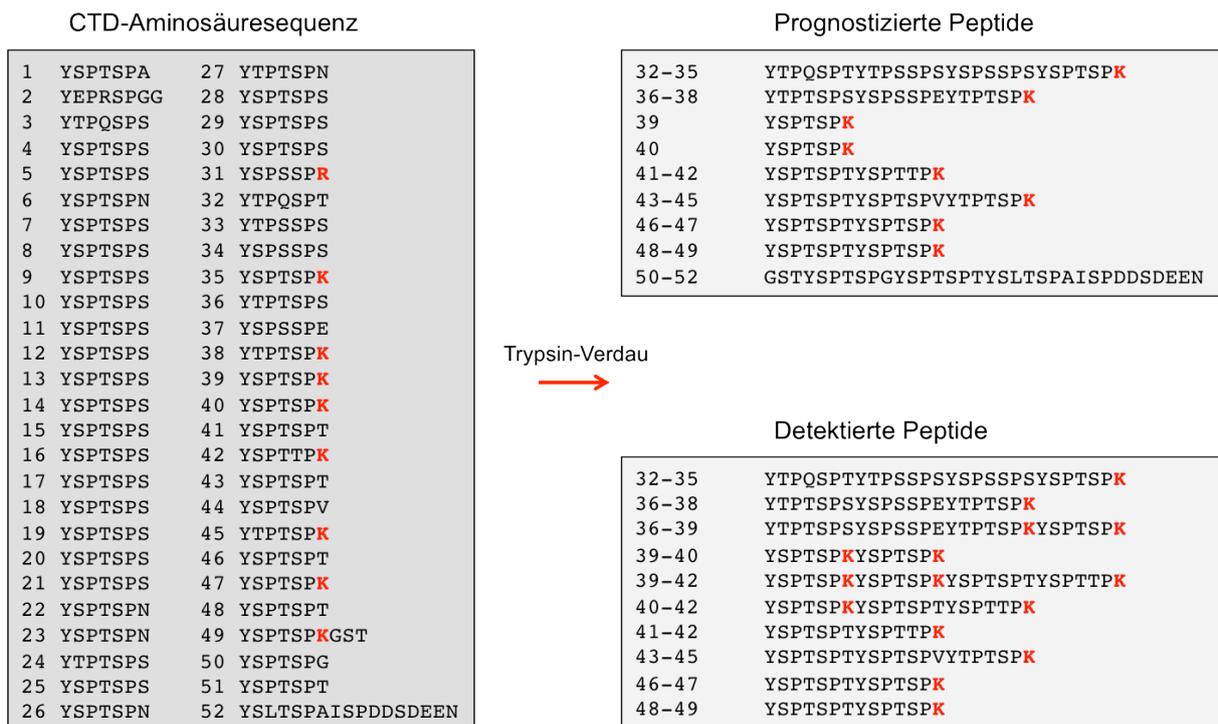
**Abbildung 11: Untersuchung der Kombinatorik an CTD-Modifikationen mittels Western-Blot-Analyse in H1299-Zellen.** Markiert sind jeweils die beiden Polymerase-Formen (IIA und IIO). Input und Überstand stellen 5% der eingesetzten Zellmenge dar.

Der 1F5-Antikörper präzipitiert die hypophosphorylierte IIA-Form der RNAPII, während die hyperphosphorylierte IIO-Form im Überstand verbleibt. Polymerasen mit einer Serin2, Threonin4 oder Serin7 Phosphorylierung in der CTD werden von dem 1F5-Antikörper nur sehr schwach präzipitiert. Lediglich Polymerasen mit einer CTD-Serin5-Phosphorylierung werden > 50% präzipitiert. Durch den 1F5-Antikörper wird offensichtlich selektiv eine RNAP IIA-Form der CTD-Serin5 phosphorylierten RNAPII präzipitiert, während die RNAP IIO-Form im Überstand verbleibt. Die vorne beschriebene Charakterisierung der Substratspezifität des 1F5-Antikörpers hat gezeigt, dass die Serin5-Phosphorylierung in einer Heptad-Wiederholung die Epitoperkennung durch den 1F5-Antikörper inhibiert. Folglich sollten nicht alle Serine an Position fünf phosphoryliert sein, um die Erkennung durch den 1F5-Antikörper noch zu ermöglichen. Weiterhin fällt auf, dass Polymerasen die sowohl eine Lysin7-Methylierung, als auch eine Serin2-, beziehungsweise Serin7-Phosphorylierung besitzen ein intermediäres Laufverhalten in der SDS-PAGE zeigen. Insgesamt scheinen die präzipitierten Polymerasen nur schwach phosphoryliert zu sein, auf

Grund der hohen Präferenz des 1F5-Antikörpers für die hypophosphorylierte RNAP IIA-Form. Dennoch wird deutlich, dass Phosphorylierungen und CTD-Methylierung gleichzeitig in der CTD vorkommen.

### 3.3. Massenspektrometrische Analyse der Lysin7-Methylierung

Monoklonale Antikörper sind ein gutes Werkzeug um Einblicke in die Modifikationen der CTD *in vivo* zu erlangen. Allerdings haben Antikörper Limitationen. Fragestellungen, ob zum Beispiel die Mono- oder Dimethylierung von Lysinen in der CTD, oder beide Modifikationen auftreten, oder wie viele Lysine in der CTD methyliert werden, können nicht mit monoklonalen Antikörpern beantwortet werden.



**Abbildung 12: Trypsin-Verdau und massenspektrometrische Analyse der Wildtyp-RNAPII-CTD.** Links: Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der 52 Heptad-Wiederholungen der Wildtyp-RNAPII. Die Heptad-Nummer ist jeweils vor der Sequenz aufgelistet. Trypsin spaltet Aminosäureketten nach Lysin und Arginin. Diese Aminosäuren sind rot unterlegt. Rechts oben: Abgebildet sind die prognostizierten Peptide nach dem Trypsin-Verdau der Wildtyp-CTD. Rechts unten: Dargestellt sind die massenspektrometrisch gemessenen Peptide nach Trypsin-Verdau der Wildtyp-CTD. Die Peptide 46-47 und 48-49 können massenspektrometrisch nicht separiert werden, auf Grund identischer Massen.

Hierfür sind massenspektrometrische Analysen der CTD notwendig. Der proximale Bereich der humanen CTD besteht fast ausschließlich auf Heptad-Wiederholungen mit der Konsensus Sequenz YSPTSPS, während im distale Bereich der CTD vor allem Serin7 oft durch andere Aminosäuren substituiert ist. Serin7 ist im distalen Bereich acht Mal durch ein Lysin und einmal durch ein Arginin ersetzt (Abb. 12, Links). Die Endopeptidase Trypsin spaltet Aminosäureketten selektiv, carboxyterminal nach Arginin und Lysin. Somit ist der distale Teil der CTD für einen Trypsin-Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse zugänglich. Die nach dem Trypsin-Verdau prognostizierten CTD-Peptide besitzen für die Massenspektrometrie eine optimale Länge zwischen sieben bis 28 Aminosäuren (Abb. 12, rechts).

Die Auswertung der detektierten tryptischen Peptide nach der Tandem-Massenspektrometrie ergab zehn verschiedene Peptide mit einer Länge von 14 bis 28 Aminosäuren. Auffällig ist, dass drei Peptide neben dem terminalen Lysin ein weiteres oder zwei weitere Lysine in der Aminosäurekette tragen (Abb. 12, rechts). Diese Peptide wurden unvollständig von Trypsin gespalten. Eine Ursache hierfür sind posttranslationale Modifikationen des Lysins, die eine reduzierte Effizienz des tryptischen Verdau zur Folge haben. Acetylierungen und Mehrfachmethylierungen führen zu sterischen Hinderungen im aktiven Zentrum der Serin-Protease Trypsin. Die Acetylierung führt gleichzeitig zum Verlust der positiven Ladung an der  $\epsilon$ -Aminogruppe, wodurch ein Aspartat im aktiven Zentrum vom Trypsin den Übergangszustand schlechter stabilisieren kann (Zee et al., 2012).

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass der distale Teil der CTD für einen tryptischen Verdau zugänglich ist und die detektierten Peptide die distale CTD abdecken.

### **3.3.1. CTD-Lysin7 ist mono-, di- und tri-methyliert.**

Für die massenspektrometrische Analyse der posttranslationalen Modifikationen des Lysin7 in der CTD wurden 300 Millionen Raji-Zellen pro Messung eingesetzt. Die RNAPII wurde mit einer Mischung der beiden phosphorylierungsspezifischen CTD-Antikörpern Ser2P/Ser5P quantitativ präzipitiert, auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch „In-Gel-Verdau“ mit Hilfe von Trypsin gespalten. Um neben der Lysin7-Modifikation zusätzliche Information über die Phosphorylierung der CTD-

## Ergebnisse

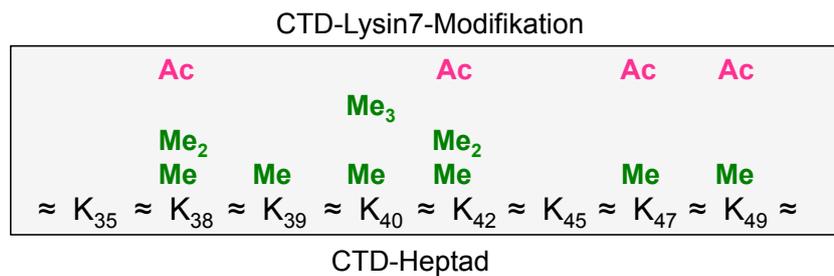
Konsensus-Wiederholung	Peptid	K-Modifikation	Phosphorylierung
32-35	YTPQSPTYTPSSPSYSPSSPSYSPTSPK		
36-38	YTPTSP <sup>S</sup> YSPSSPEYTPASP <sup>K</sup>	K <sub>38</sub> me	S <sub>7</sub>
	YTPTSPSYSP <sup>S</sup> SPEYTPASP <sup>K</sup>	K <sub>38</sub> me	S <sub>11</sub>
36-39	Y <sup>T</sup> PTSPSYSPSSPEYTPASP <sup>K</sup> YSPT <sup>S</sup> PK	K <sub>38</sub> me <sub>2</sub> , K <sub>39</sub> me	T <sub>2</sub> , S <sub>26</sub>
	YTPTSPSYSP <sup>S</sup> SPEYTPA <sup>S</sup> PKYSPTSPK	K <sub>38</sub> me <sub>2</sub> , K <sub>39</sub> me	S <sub>12</sub> , S <sub>19</sub>
39-40	Y <sup>S</sup> PTSP <sup>K</sup> YSPTSPK	K <sub>39</sub> Ac	S <sub>2</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PKYSPTSPK	K <sub>39</sub> Ac	S <sub>5</sub>
	YSPTSP <sup>K</sup> Y <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>39</sub> Ac	Y <sub>8</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PKYSPTSPK	K <sub>39</sub> Ac, K <sub>40</sub> me	T <sub>4</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PKYSPTSPK	K <sub>39</sub> Ac, K <sub>40</sub> me	S <sub>5</sub>
39-42	YSPT <sup>S</sup> PKYSPTSPKYSPTSPTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>42</sub> Ac	T <sub>4</sub> , S <sub>23</sub>
	YSPTSP <sup>K</sup> YSPTSP <sup>K</sup> YSPTSPTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>39</sub> me, K <sub>40</sub> me <sub>3</sub>	Y <sub>15</sub> , Y <sub>22</sub>
	YSPTSP <sup>K</sup> YSPTSP <sup>K</sup> YSPT <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>39</sub> me, K <sub>40</sub> me <sub>3</sub>	S <sub>16</sub> , S <sub>19</sub>
	YSPTSPK <sup>Y</sup> SPTSPK <sup>Y</sup> SPTSPTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>42</sub> Ac	Y <sub>8</sub> , Y <sub>15</sub>
40-42	YSPT <sup>S</sup> PKYSPT <sup>S</sup> PTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>40</sub> me	T <sub>4</sub> , S <sub>12</sub> , S <sub>16</sub>
41-42	Y <sup>S</sup> PTSPTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>42</sub> me	Y <sub>1</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>42</sub> me	T <sub>4</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>42</sub> me	S <sub>5</sub>
	YSPTSPTY <sup>S</sup> PTTPK	K <sub>42</sub> me <sub>2</sub>	T <sub>11</sub> , T <sub>12</sub>
43-45	YSPTSPTY <sup>S</sup> PTSPVYTP <sup>T</sup> SPK		
46-47 und 48-49	Y <sup>S</sup> PTSPTY <sup>S</sup> PT <sup>T</sup> SPK	K <sub>47/49</sub> me	Y <sub>1</sub> , T <sub>11</sub>
	Y <sup>S</sup> PTSPTY <sup>S</sup> PTSP <sup>K</sup>	K <sub>47/48</sub> Ac	Y <sub>1</sub>
	Y <sup>S</sup> PTSPTY <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> me	Y <sub>1</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PTY <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> Ac	T <sub>4</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PTY <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> me	T <sub>4</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PTY <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> Ac	S <sub>5</sub>
	YSPT <sup>S</sup> PTY <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> me	S <sub>5</sub>
	YSPTSP <sup>T</sup> Y <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> Ac	T <sub>7</sub>
	YSPTSP <sup>T</sup> Y <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> me	T <sub>7</sub>
	YSPTSP <sup>T</sup> Y <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> Ac	Y <sub>8</sub>
	YSPTSP <sup>T</sup> Y <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> me	Y <sub>8</sub>
	YSPTSPTY <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> Ac	S <sub>9</sub>
	YSPTSPTY <sup>S</sup> PT <sup>T</sup> SPK	K <sub>47/48</sub> me	T <sub>11</sub>
	YSPTSPTY <sup>S</sup> PT <sup>S</sup> PK	K <sub>47/48</sub> Ac	S <sub>12</sub>
YSPTSPTY <sup>S</sup> PTSPK	K <sub>47/48</sub> me		

**Abbildung 13: Massenspektrometrische Analyse der Wildtyp-RNAPII-CTD.** Dargestellt sind posttranslationalen Modifikationen der detektierten Lysin-CTD-Peptide. Modifikationen sind durch ein Farbschema gekennzeichnet: Phosphorylierung: Orange, Methylierung: Grün, Acetylierung: Pink.

Peptide zu erlangen, wurden phosphorylierte Peptide durch Titan-Dioxid-Säulen angereichert.

Die Auswertung der Peptidmodifikationen erfolgte mit der Software "phosphoRS". PhosphoRS berechnet die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung für alle potentiellen Phosphorylierungsstellen in einem Peptid auf Grundlage der Tandem-Massenspektrometrie Daten.

Die massenspektrometrischen Ergebnisse belegen, dass Lysin7 in der CTD neben der Mono- und Di-Methylierung auch eine Tri-Methylierung tragen kann und dass benachbarte Lysine einen unterschiedlichen Methylierungsgrad aufweisen können (Abb. 13, Peptid 39-42). Es fällt auf, dass ein höherer Methylierungsgrad des Lysins mit der Phosphorylierung benachbarter Aminosäuren einhergeht (Abb. 13, Peptid 41-42). Die RNAP IIA-Form scheint mono-methyliert zu sein, während ein höherer Methylierungsgrad des Lysins gehäuft in der transkriptionsaktiven RNAP II0-Form vorkommt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der 1F5-Immunpräzipitationsexperimente. Der 1F5-Antikörper präzipitiert vor allem die RNAP IIA-Form sowie eine intermediäre RNAPII-Form zwischen der RNAP IIA und RNAP II0 (Abb. 11). Die Methylierung von intermediären RNAPII-Formen hat bereits angedeutet, dass auch die RNAP II0-Form methyliert sein könnte. Ein hoher Phosphorylierungsgrad der RNAP II0-Form könnte aber die Erkennung durch den 1F5-Antikörper verhindern.



**Abbildung 14: Die posttranslationalen Modifikationen des Lysin7 in der CTD.** Schematische Zusammenfassung der posttranslationalen Modifikationen der acht Lysine in der CTD. Lysin-Methylierungen sind grün und Acetylierungen pink unterlegt.

Neben der Methylierung kann auch die Acetylierung des Lysin7 in der CTD massenspektrometrisch gezeigt werden. Acetylierung und Methylierung können im selben Peptid an zwei aufeinanderfolgenden Lysinen aber auch in verschiedenen Peptiden am selben dem selben Lysin auftreten (Abb. 13, Peptid 39-40). Allerdings

scheint eine benachbarte Acetylierung eine Di- oder Tri-Methylierung auszuschließen (Abb. 13, Peptid 39-40). Acetylierungen treten vor allem in phosphorylierten Peptiden auf und scheinen somit ein Charakteristikum für die transkribierende RNAP II<sub>0</sub>-Form zu sein.

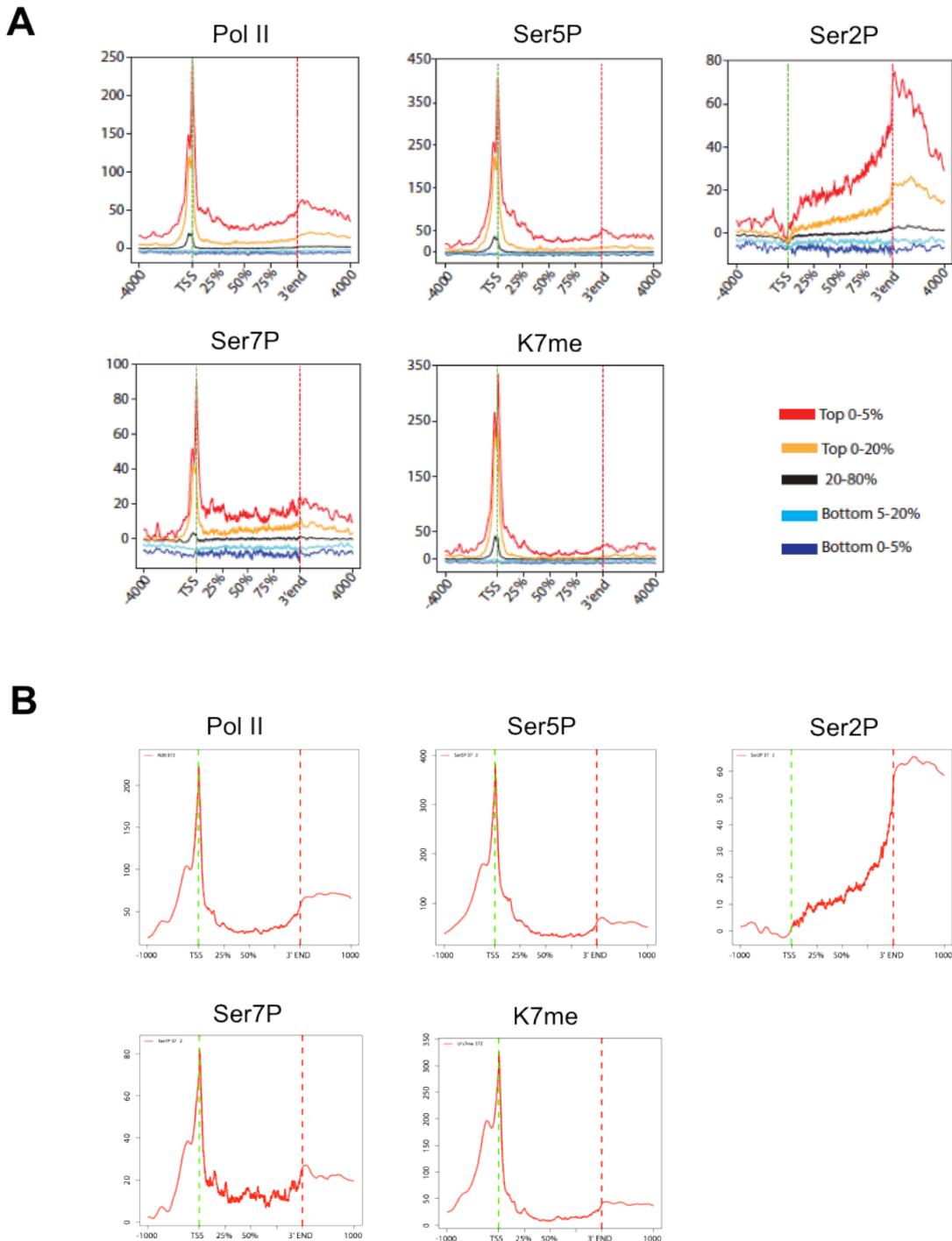
Zusammenfassend konnte durch die massenspektrometrische Analyse des distalen Bereichs der CTD gezeigt werden, dass die Lysine in der CTD mono-, di- und trimethyliert, sowie acetyliert werden. Keine posttranslationalen Modifikationen konnten an den Lysininen in den CTD-Heptaden 35 und 45 nachgewiesen werden. Unklar ist derzeit, ob dieses Ergebnis technische Ursachen hat. Die Acetylierung konnte an vier verschiedenen Lysininen gezeigt werden und tritt vor allem in phosphorylierten Peptiden auf. Die Methylierung konnte an sechs verschiedenen Lysininen identifiziert werden, wobei die Di- und Tri-Methylierung tendenziell an stark phosphorylierten Peptiden auftritt (Abb. 14). Die diversen posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten des Lysins erweitern den CTD-Code deutlich.

### **3.4. Genomweites Profil der CTD-Lysin7-Methylierung**

Da der 1F5-Antikörper für die Immunpräzipitation geeignet ist, soll weiterführend die genomweite Verteilung der K7me-modifizierten RNAPII mittels ChIP (Chromatinimmunpräzipitation) analysiert werden. Für die ChIP wurden Raji-Zellen eingesetzt und die anschließende DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Standardprotokoll von Illumina.

Das ChIP-Profil für die genomweite Verteilung der RNAPII zeigt eine starke Anreicherung der Polymerase an der TSS (Transkriptionsstartstelle), eine Abnahme in der Mitte der Gene und eine erneute Anreicherung im Bereich des 3'Endes. Charakteristisch für eine initiiierende, Serin5-phosphorylierte RNAPII ist eine starke Anreicherung im Bereich der TSS. Eine elongierende RNAPII ist gekennzeichnet durch Phosphorylierungen des Serins an Position zwei in der CTD. Das ChIP-Profil zeigt für diese Modifikation eine stetige Zunahme nach der TSS und erreicht das Maximum am 3'Ende der Gene. Polymerasen mit einer Serin7-Phosphorylierung in der CTD sind vor allem an der TSS angereichert. Das Profil für Lysin7-Methylierung zeigt eine starke Akkumulation an der TSS der Gene und sinkt nach der TSS sehr deutlich ab (Abb. 15, A). Die Betrachtung des ChIP-Profiles der Lysin7-methylierten RNAPII mit den stärksten Signalen (Top 20%) verdeutlicht ein erstes Maximum circa

## Ergebnisse



**Abbildung 15: CTD-K7-methylierte RNAPII ist an der TSS von Genen angereichert.** Dargestellt sind die genom-weiten ChIP-Seq-Profile für die gesamte RNAPII (Pol II), einer Ser5, Ser2 und Ser7 phosphorylierten und der Lysin7-methylierten RNAPII in Raji-Zellen. Die Diagramme fassen die durchschnittlichen Transkriptionseinheiten von Genen die > 4 kb sind zusammen. Die gestrichelte, grüne Linie markiert die Transkriptionsstartstelle (TSS) und die rote Linie das 3'Ende der Gene. **A)** Genomweite Verteilung der RNAPII, sowie der verschiedenen CTD-Modifikationen. Die Profile zeigen farblich unterteilt verschiedene Gruppen von Genen in Abhängigkeit von den Signal-Intensitäten. **B)** ChIP-Seq-Profile der gesamten RNAPII und den RNAPII-CTD-Modifikationen für die Gene mit den stärksten Signalen (Top 20%). Die ChIP-Seq Daten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Andrau (Marseille/Montpellier) erhoben.

200 bp vor der TSS und ein zweites Maximum mit der höchsten Signalintensität an der TSS. Zusätzlich wird eine weitere Anreicherung im Bereich des 3'Endes der Gene ersichtlich, die über das 3'Ende hinaus erhalten bleibt (Abb. 15, B).

Das K7me-ChIP-Profil könnte auf eine funktionale Bedeutung dieser CTD-Modifikation während beziehungsweise vor der Transkriptionsinitiation und der Termination hindeuten. Bei der Interpretation der ChIP-Profile gilt es aber zu beachten, dass die Bindung des 1F5-Antikörpers durch andere posttranslationale Modifikationen in der CTD beeinflusst werden kann (Hintermair et al., 2012). Die vorangegangene Charakterisierung des 1F5-Antikörpers zeigte, dass eine benachbarte Serin5-Phosphorylierung in der CTD die Epitoperkennung des Antikörpers inhibiert. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die CTD auch nach der TSS methyliert ist, da eine Serin5-Phosphorylierung der CTD auch während der Transkription charakteristisch ist.

### **3.5. Der Vergleich Con48 und recWT – Ähnlich aber nicht gleich?**

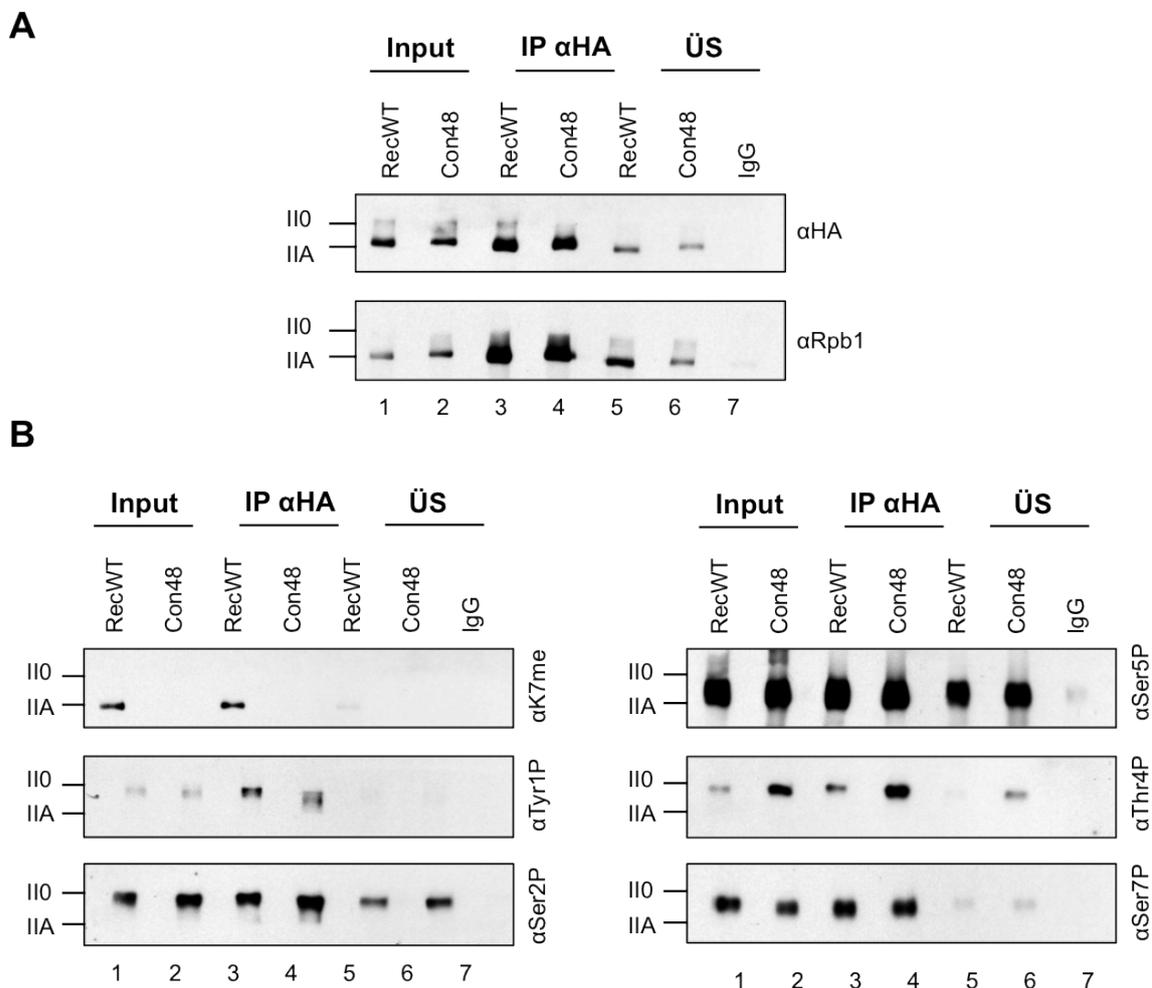
Mit Hilfe der Rpb1-CTD-Mutanten kann die Bedeutung der Nicht-Konsensus-Aminosäuren genauer charakterisiert werden. Der Vergleich der CTD in der Hefe und Mensch zeigt zwei wesentliche Unterschiede. Mit 26 Heptad-Wiederholungen ist die Hefe-CTD nur halb so lang und besteht fast ausschließlich aus Konsensus-Sequenzen. Die humane CTD besteht aus 52 Heptad-Wiederholungen und > 50% haben eine Nicht-Konsensus-Sequenz (Corden, 2013). Auf Grund dieser Unterschiede ergeben sich die Fragen, ob die Nicht-Konsensus-Aminosäuren Bindungsmotiv für akzessorische Proteine darstellen und ob das Fehlen von Nicht-Konsensus-Aminosäuren Einfluss auf die CTD-Phosphorylierungen hat? Beide Fragen sollen durch eine vergleichende Analyse des recWTs und der Con48-Mutante beantwortet werden. Bekannt ist bereits, dass die Proliferationsrate von Zellen, die Con48 oder recWT exprimieren unter normalen Zellkulturbedingungen gleich ist (Hintermair et al., 2012).

Für den Vergleich wurden recWT und Con48 stabil in Raji-Zellen exprimiert. Die Expression wurde für 24 Stunden durch Auswaschen von Tetracyclin induziert und anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt. Mit Hilfe des HA-Tags wurden die rekombinanten Polymerasen präzipitiert und mittels Western-Analyse auf ihre CTD-Modifikationen untersucht. Beide Polymerasen zeigen

## Ergebnisse

ein vergleichbares Expressionsniveau sowohl für die RNAP IIA- als auch für die RNAP IIO-Form. Durch die Immunpräzipitation konnten beide Polymerasen gleichmäßig und quantitativ angereichert werden (Abb. 16 A).

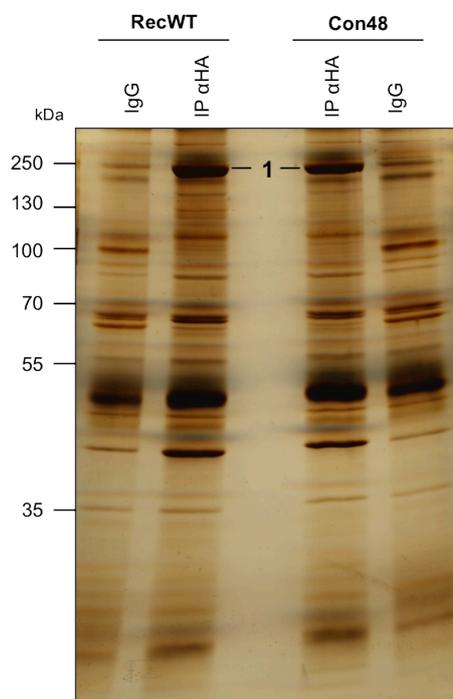
In der Western-Analyse können Signale für die CTD-Lysin7-Methylierung nur für den recWT beobachtet werden, nicht aber für die Con48-Mutante. RecWT und Con48 zeigen beide CTD-Phosphorylierungen für Tyrosin1, Serin2, Serin5 und Serin7. Auffällig ist die Threonin4-Phosphorylierung, die in der Con48-Mutante verstärkt detektierbar ist (Abb. 16 B). Insgesamt sind die getesteten CTD-Phosphorylierungen sowohl in recWT als auch in Con48 vorhanden und zeigen nur kleine Unterschiede in ihrer Abundanz.



**Abbildung 16: Die CTD-Modifikationen in recWT- und Con48-Polymerasen.** Die Expression der rekombinanten Polymerasen wurde für 24 h induziert und anschließend die Zellen für 48 h mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt. Immunpräzipitationen des recWT und Con48 über ihren HA-Tag aus Zellextrakten. Die präzipitierten Polymerasen wurden mittels Western-Analyse untersucht. Input und Überstand stellen 5% der eingesetzten Zellmenge dar. IP: Immunpräzipitation, ÜS: Überstand.

### 3.5.1. Das Interaktom der recWT- und Con48-Polymerase

Eine mögliche Erklärung, warum es in der Evolution zu Aminosäuresubstitutionen im distalen Bereich der CTD gekommen ist, könnten neue daraus resultierende Bindungsmotive sein. Mit zunehmender Komplexität der Organismen wird die Genregulation und die damit verbundene Transkriptionskontrolle vielschichtiger. Die Rekrutierung bestimmter Transkriptionsfaktoren in höheren Eukaryonten könnte von Nicht-Konsensus-Aminosäuren abhängig sein. Zur Validierung, ob die Nicht-Konsensus-Wiederholungen in der CTD für die spezifische Bindung bestimmter Faktoren von Bedeutung sind, wurde das Interaktom von recWT und Con48 massenspektrometrisch untersucht. Voraussetzung hierfür ist, dass die Polymerasen und akzessorische Proteine über die HA-getaggte Rpb1-Untereinheit quantitativ präzipitiert werden können. Raji-Zellen die recWT beziehungsweise Con48 exprimieren wurden für drei Tage in Gegenwart von  $\alpha$ -Amanitin kultiviert. Anschließend wurden die rekombinanten Polymerasen über den HA-Tag präzipitiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 17).

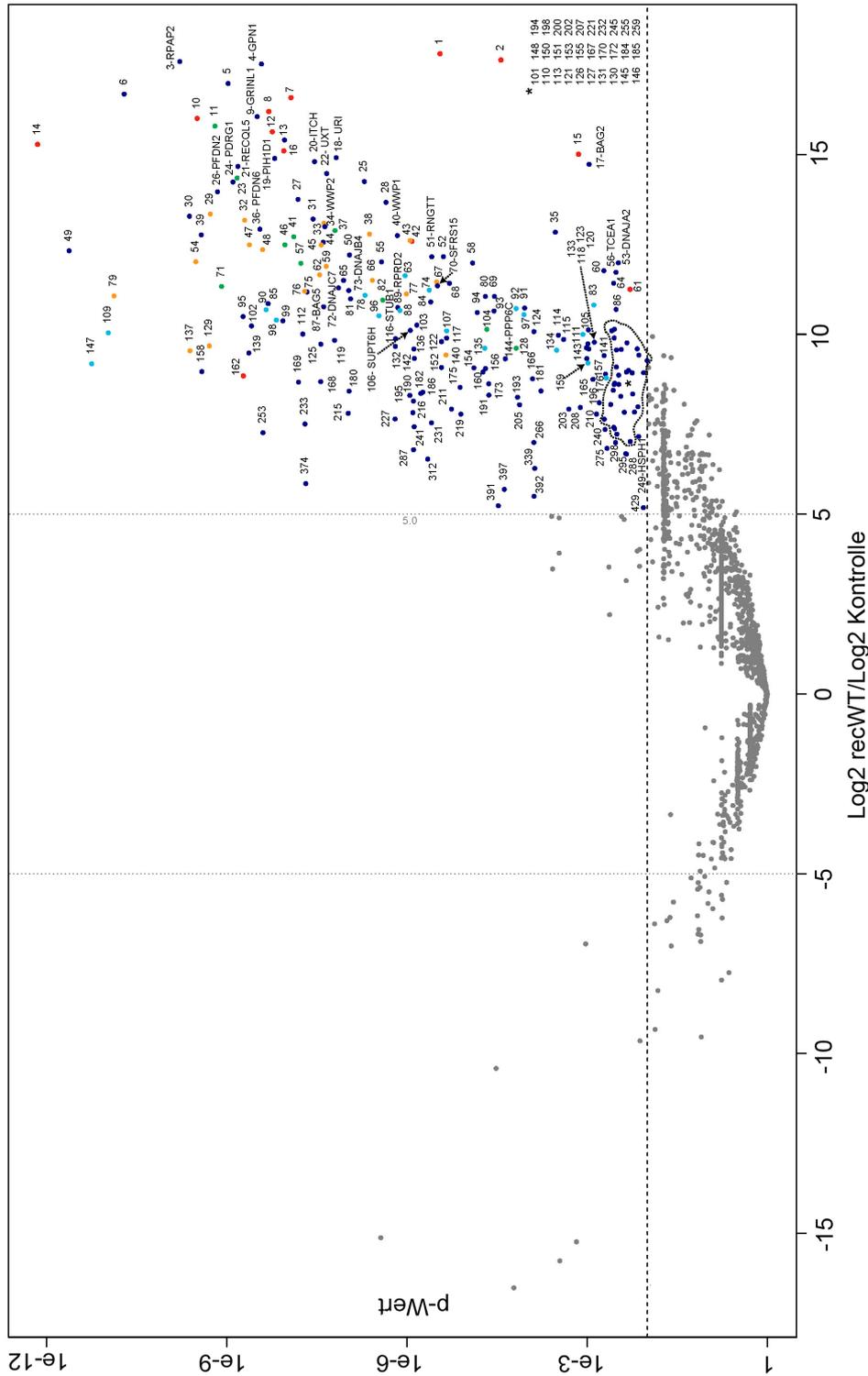


**Abbildung 17: Silberfärbung eines SDS-Gels mit präzipitierter recWT- und Con48-RNAPII.** Die Expression der rekombinanten Polymerasen wurden in Raji-Zellen für 24 h induziert und anschließend  $\alpha$ -Amanitin dem Zellkulturmedium hinzugefügt. Die RNAPII wurde über den HA-Tag aus  $1 \times 10^8$  Zellen präzipitiert. Bande 1: Rpb1-Untereinheit.

Der Vergleich mit den jeweiligen Isotypkontrollen zeigt, dass die etwa 250 kDa große Rpb1-Untereinheit der RNAPII im recWT und in Con48 angereichert ist (Abb. 17). Weiterhin ist ersichtlich, dass sich die Bandenmuster zwischen der IgG-Kontrolle und den Präzipitationen der RNAPII deutlich voneinander unterscheiden. Vor allem im Bereich zwischen 250 kDa und 70 kDa sind eine Vielzahl feiner Banden zu erkennen, die meist in der Kontrolle fehlen. Diese Banden repräsentieren Untereinheiten der RNAPII oder RNAPII-interagierende Proteine. Deutliche Unterschiede beim Vergleich des Bandenmusters vom recWT und Con48 können nicht ausgemacht werden.

Um nicht nur das Interaktom von recWT und Con48 zu vergleichen, sondern auch Proteine identifizieren zu können, die spezifisch mit der RNAPII interagieren, wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Neben der Präzipitation der rekombinanten RNAPII über ihren HA-Tag wurden auch die Proteine Pes1 (*Pescadillo*) und Bop1 (*Block of Proliferation 1*) mit spezifischen monoklonalen Antikörpern präzipitiert. Pes1, Bop1 und WDR12 (WD-repeat protein12) bilden den trimere PeBoW-Komplex, der essentiell für die rRNA Prozessierung in Säugetierzellen ist (Grimm et al., 2006, Hölzel et al 2005). Die präzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut, eluiert und die Peptide massenspektrometrisch durch Dr. Forne analysiert. Massenspektrometrische Analysen von drei biologischen Replikaten führten insgesamt zu mehr als 1500 Proteinen die mit der RNAPII oder einen der PeBoW-Proteine interagieren. Zur Identifikation von Proteinen, die spezifisch an die RNAPII binden wurde ein Vergleich von recWT mit den Kontrollen (Pes1, Bop1) durchgeführt und in einem Volcano Diagramm dargestellt. In dem Diagramm sind die Proteine abgebildet, die mindestens eine Veränderung um den Faktor  $2^5$  im Vergleich zur Kontrolle (Pes1, Bop1) aufweisen und mindestens ein Signifikanzniveau von 0,01 haben. In der Analyse konnten alle 12 Untereinheiten der RNAPII detektiert werden (rote Punkte Abb. 18, Tabelle A1 im Anhang). Der Integrator-Komplex, der an die RNAPII-CTD bindet und für die snRNA-Prozessierung essentiell ist (Egloff et al., 2007), konnte ebenfalls fast vollständig in der massenspektrometrischen Analyse nachgewiesen werden und ist durch grüne Punkte dargestellt. Durch gelbe Punkte ist der Mediator-Komplex abgebildet, der bis auf die Kinase-Untereinheiten (CycC, Cdk8) weitgehend vollständig identifiziert wurde. Die hellblauen Punkte repräsentieren Untereinheiten des Proteasoms.

# Ergebnisse



**Abbildung 18: Das Interaktom der RNAPII.** Das Volcano Diagramm vergleicht den recWT mit den Kontrollen (Pes1 und Bop1) und zeigt alle Proteine mit einer Veränderung von mindestens  $2^5$  und einem p-Wert  $< 0,01$ . Die Werte basieren auf drei biologischen Replikaten. Rote Punkte: Untereinheiten der RNAPII; grüne Punkte: Untereinheiten des Integrator; gelbe Punkte: Untereinheiten des Mediators; hellblaue Punkte: Untereinheiten des Proteasoms. Die weiteren Proteine sind durch Nummern gekennzeichnet. Die gesamte Liste kann dem Anhang entnommen werden.

## Ergebnisse

**Tabelle 1: Proteinkomplexe und einzelne Proteine, die massenspektrometrisch als RNAPII assoziiert identifiziert wurden.** Aufgelistet sind Proteine, die beim Vergleich vom recWT mit den Kontrollen (Pes1 und Bop1) einen p-Wert < 0,05 aufweisen. In den Klammern sind die Proteinnummern aus der Gesamtliste bzw. dem Volcano Diagramm angegeben (s. Anhang A1). Die Werte basieren auf drei biologischen Replikaten.

RNAPII	Rpb1 (69), Rpb2 (1), Rpb3 (2), Rpb4 (12), Rpb5 (15), Rpb6 (42), Rpb7 (7), Rpb8 (61), Rpb9 (8), Rpb10 (16), Rpb11 (162), Rpb12 (10)
Integrator	INTS1 (46), INTS2 (82), INTS (11), INTS4 (104), INTS5 (41), INTS6 (23), INTS7 (128), INTS8 (57), INTS9 (70), INTS11 (81), INTS12 (37)
Mediator	MED1 (77), MED4 (48), MED6 (43), MED7 (66), MED8 (54), MED9 (209), MED10 (59), MED11 (137), MED14 (45), MED15 (140), MED16 (129), MED17 (33), MED18 (252), MED19 (62), MED20 (32), MED21 (79), MED22 (75), MED23 (305), MED24 (236), MED27 (29), MED28 (234), MED29 (320), MED30 (67), MED31 (47),
Prefoldin/R2TP	RPAP3 (13), URI (18), PIH1D1 (19), UXT (22), PDRG1 (24), PFDN2 (26), PFDN6 (36), RUVBL1 (126), RUVBL2 (149)
26S Proteasom	PSMA1 (165), PSMA2 (110), PSMA3 (107), PSAMA5 (98), PSMA6 (63), PSMA7 (83), PSMB1 (74), PSMB2 (92), PSMB3 (76), PSMB4 (88), PSMB5 (219), PSMB6 (285), PSMB7 (263), PSMB8 (317), PSMB10 (292), PSMC1 (96), PSMC2 (131), PSMC3 (130), PSMC4 (123), PSMC5 (229), PSMC6 (141), PSMD1 (109), PSMD2 (159), PSMD3 (78), PSMD4 (90), PSMD6 (97), PSMD7 (134), PSMD8 (135), PSMD11 (111), PSMD12 (103), PSMD14 (147)
Trankriptionsfaktoren	TCEA1 (56), GTF2F2 (434)
Translationsfaktoren	EEF1E1 (332), EEF1G (261), ELF3E (298), EIF3F (301), EIF3G (458), EIF3I (376)
MCM-Komplex	MCM4 (423), MCM5 (274), MCM7 (146)
Phosphatsen	PPP3R1 (25), PPP6R1 (142), PPP6C (144), CTD1P1 (175), PPP2CA (365)
Chaperone	DNAJA1 (100), DNAJA2 (53), DNAJA3 (153), DNAJB1 (174), DNAJB4 (73), DNAJB6 (101), DNAJC1 (213), DNAJC7 (72), HSP90A (302), HSPH1 (249), HSPA4 (340)
Ub-Ligasen	ITCH (20), WWP1 (40), WWP2 (34), RBX1 (112), STUB1 (116), RNF126 (312), RNF7 (355), CUL1 (381), BRCC3 (384)
Histon modifizierende Enzyme, Chromatin Remodeling	RBBP4 (151), CARM1 (194), PRMT5 (201), HDAC1 (300), SUPT6H (106)
weitere	PCNA (178), RINGTT (51), XRN2 (290), SNRPB (222), RPAP2 (3), RPRD1B (6), RPRD1A (27), RPAP3 (13), RPAP1 (374), RECQL5 (21), GPN1 (4), GPN3 (5), GPN2 (158), SFRS15 (70), RSP27 (138)

Eng verknüpft mit dem Proteasom sind E3-Ubiquitin-Ligasen, die gleich mehrfach nachgewiesen werden konnten, insbesondere mehrere HECT-E3-Ligasen (WWP1, WWP2, ITCH). Eine weitere große Protein-Gruppe sind die Chaperone. So konnte der hexamere Prefoldin-Komplex (URI, PDRG1, PFDN2, PFDN6, UXT, WDR92), sowie der daran gebundene R2TP-Komplex (PIH1D1, RUVB1, RUVB2, RPAP3) nachgewiesen werden (Millan-Zambrano et al., 2014). Ebenfalls wurden Transkriptionsfaktoren (TCAF1), Capping Enzyme (RNGTT), Phosphatasen (PPP6C, RPAP2), Teile des MCM-Komplexes und die CTD-R1810 Arginin-Methyl-Transferase CARM1 (Sims et al., 2011) detektiert (Tab. 1). Die Bandbreite an interagierenden Proteinen belegt, wie eng der Komplex die Transkription reguliert ist und wie eng verschiedenste zelluläre Prozesse verzahnt sind.

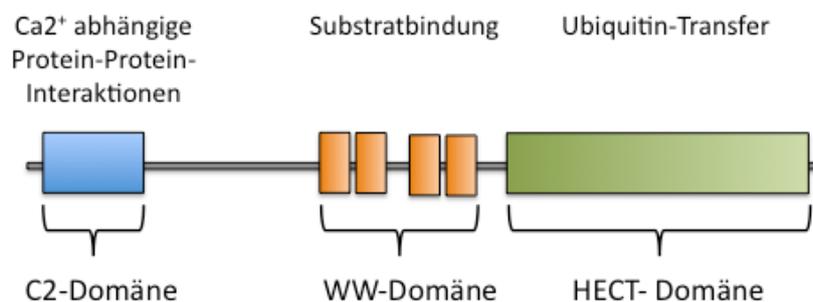
Neben der Analyse des RNAPII-Interaktoms war eine zentrale Fragestellung, ob die Nicht-Konsensus-Aminosäuren ein Bindungsmotiv für akzessorische Proteine darstellen. Der direkte Vergleich des recWT- und Con48-Interaktoms erbrachte keine darstellbaren Unterschiede. Alle Proteine, die reproduzierbar mit recWT interagieren, konnten auch mit Con48 detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Nicht-Konsensus-Aminosäuren in der CTD kein essentielles Bindungsmotiv für Proteine darstellen, die von grundlegender Bedeutung für die Transkription unter normalen Zellkulturbedingungen sind. Das Ergebnis ist übereinstimmend mit der vergleichbaren Proliferationsrate von recWT und Con48. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Optimierungen der Proteinanreicherung und sensitivere massenspektrometrische Methoden zukünftig einen noch präziseren Einblick in das Interaktom von RNAPII erlauben und Unterschiede zwischen recWT und Con48 zeigen.

### **3.6. Interagiert die E3-Ubiquitin-Ligase WWP1 mit RNAPII?**

Die Analyse des RNAPII-Interaktoms zeigt, dass RNAPII mit großen Proteinkomplexen, aber auch mit einer Vielzahl einzelner Proteine interagiert. Von besonderem Interesse ist dabei, dass die RNAPII mit dem Proteasom assoziiert ist, sowie mit mehreren Ubiquitin-Ligasen, die Bestandteile des Ubiquitin-Proteasom-Systems darstellen. E3-Ubiquitin-Ligasen fügen mit Hilfe des E1-Aktivierenden- und des E2-Konjugierenden-Enzyms Monoubiquitinierungen oder Polyubiquitin-Ketten an Lysin-Reste von Proteinen an. Während die Monoubiquitinierung, wie die von Histon

H2B, meist regulatorische Funktionen in der Zelle erfüllen, führt die Polyubiquitinierung von Lysinen in einem Protein in der Regel zum proteasomalen Abbau.

Die Lysine im distalen Teil der CTD stellen ein potentielles Substrat für Ubiquitin-Ligasen dar. Aufgrund dessen ergab sich die Fragestellung, ob die E3-Ligase WWP1 mit der RNAPII-CTD interagiert und die Lysine in der CTD ubiquitinieren kann. WWP1 gehört zur Proteinfamilie der HECT-E3-Ligasen, die alle einen charakteristischen Aufbau aus einer N-terminalen C2-Domäne, zwei bis vier WW-Domänen und der C-terminalen HECT-Domäne besitzen. Die C2-Domäne bindet Calcium als auch Phospholipide und vermittelt die Bindung an intrazelluläre Membranen (Dunn et al, 2004). Weiterhin scheint die C2-Domäne eine Rolle bei der Autoinhibition der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität zu spielen (Wang et al., 2010, Wiesner et al., 2007). WWP1 besitzt vier Tandem-WW-Domänen, die jeweils zwei konservierte, namensgebende Tryptophane tragen. Die WW-Domänen vermitteln die Bindung zum Substratprotein und besitzen eine Präferenz für prolinreiche Motive mit einer PPXY bzw. PY Konsensussequenz (P steht für Prolin, Y für Tyrosin und X für einen beliebige Aminosäure) (Wegierski, 2006). C-Terminal befindet sich die HECT-Domäne, die mit rund 350 Aminosäuren die größte funktionale Domäne darstellt und für die katalytische E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität verantwortlich ist (Verdecia et al., 2003) (Abb. 19).

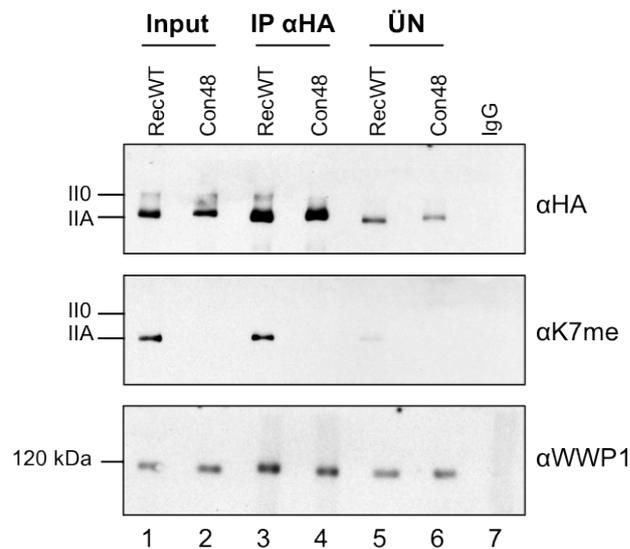


**Abbildung 19: Schematische Darstellung von WWP1.** WWP1 besitzt N-terminal eine C2-Domäne (blau), vier WW-Domänen (orange) mit jeweils zwei konservierten Tryptophanen (W) sowie eine C-terminale HECT-Domäne (grün), die für die Ubiquitin-Ligase-Aktivität verantwortlich ist und ein konserviertes Cystein im katalytischen Zentrum trägt.

Im Folgenden soll die bisher nicht charakterisierte Interaktion zwischen der RNAPII der E3-Ubiquitin-Ligase WWP1 validiert werden. Eine erste Fragestellung war, ob die Bindung von WWP1 an die RNAPII von den Lysinen der distalen CTD abhängig ist.

## Ergebnisse

Dazu wurden Raji-Zellen mit recWT- und Con48-Vektoren stabil transfiziert und die Expression der rekombinanten Rpb1-Untereinheiten induziert. 24 Stunden nach der Induktion wurde das Zellkulturmedium mit  $\alpha$ -Amanitin versetzt und nach weiteren 48 Stunden die rekombinanten Polymerasen über ihren HA-Tag präzipitiert. Die Westen-Analyse zeigt, dass beide rekombinanten Polymerasen exprimiert und gleichmäßig präzipitiert werden. Zur Kontrolle der vollständigen Hemmung der endogenen RNAPII wurden die Zellextrakte auf die Methylierung des Lysin7 in der CTD überprüft. Con48 besitzt im Vergleich zur recWT keine Lysine im distalen Bereich der CTD und zeigt in der Western-Analyse keine Reaktivität für Lysin7-Methylierung (Abb. 20,  $\alpha$ K7me). Die Proteinmenge der E3-Ubiquitin-Ligase WWP1 ist in den beiden Zelllinien unabhängig von der Expression der rekombinanten RNAPII und der  $\alpha$ -Amanitin-Behandlung. RecWT und Con48 interagieren im gleichem Maße mit WWP1 (Abb. 20,  $\alpha$ WWP1). Dies verdeutlicht, dass die Interaktion mit WWP1 unabhängig von den Nicht-Konsensus-Aminosäuren in der CTD ist und keine Lysine benötigt.



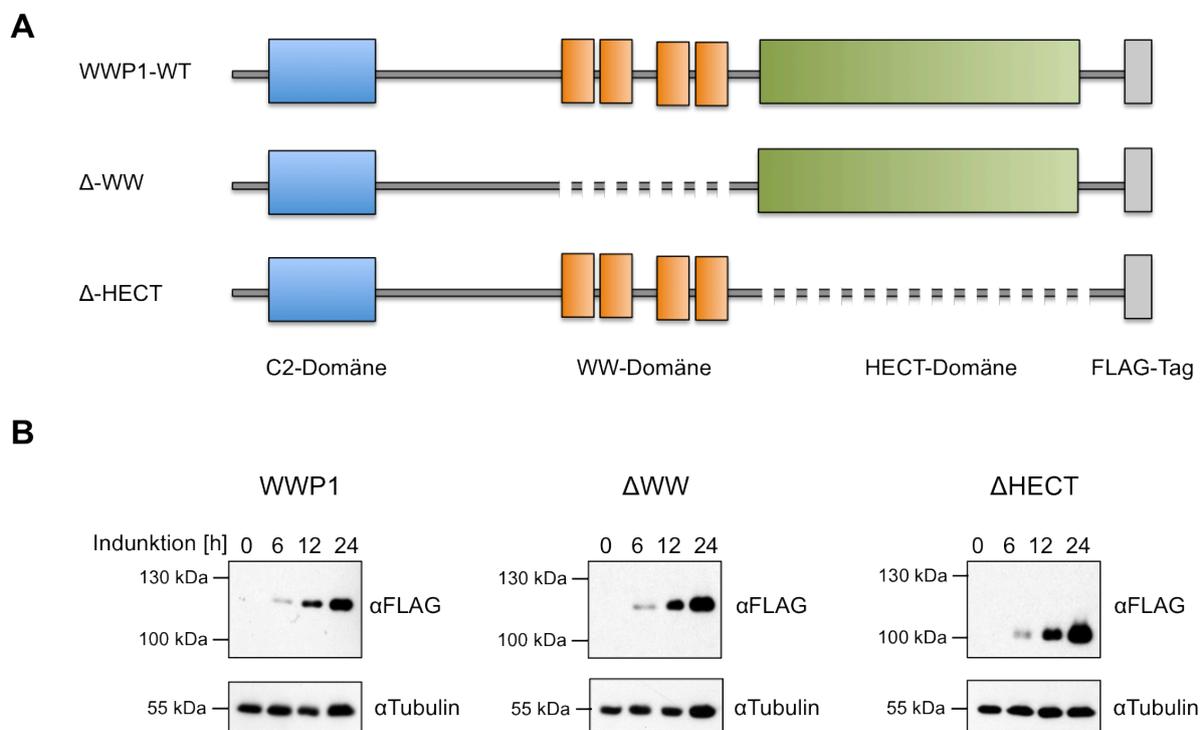
**Abbildung 20: Ko-Immünpräzipitation von WWP1 mit recWT und Con48.** 24 h nach der Induktion von recWT und Con48 wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt. Die Immunpräzipitation der rekombinanten Polymerasen über den HA-Tag erfolgte nach einer Expressionsdauer von 72 h. Als Kontrolle für Inhibierung der endogenen RNAPII wurde der K7me-Antikörper eingesetzt.

### 3.6.1. Expression von WWP1-Mutanten

Um die Interaktion zwischen WWP1 und der RNAPII näher analysieren zu können wurde die cDNA von WWP1 C-terminal mit einem FLAG-Tag versehen und in einen

## Ergebnisse

induzierbaren Vektor kloniert. Des Weiteren wurden die Mutanten  $\Delta$ WW und  $\Delta$ HECT generiert, mit Deletionen der WW-Domänen ( $\Delta$ WW) beziehungsweise der enzymatischen HECT-Domäne ( $\Delta$ HECT) (Abb. 21 A). Die Induzierbarkeit und Expression der Mutanten wurde in H1299-Zellen mittels einer Zeitkinetik untersucht.

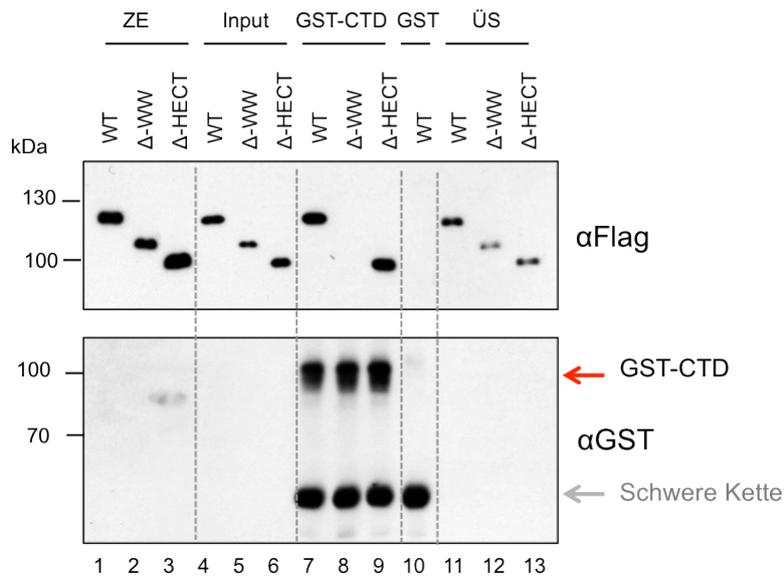


**Abbildung 21: Herstellung und Expression von induzierbaren WWP1-Mutanten.** A) Schematische Darstellung der WWP1-Expressionskonstrukte. B) Expression von WWP1 und Deletionsmutanten in H1299-Zellen nach der Induktion mit Doxycyclin. Die Expressionslevel der rekombinanten Proteine wurde in der Western-Analyse durch einen FLAG-Antikörper bestimmt und Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Hierfür wurden die Zellen stabil mit den WWP1-Vektoren transfiziert und mit Hygromycin selektioniert. Anschließend wurde die Expression der WWP1-Mutanten durch die Zugabe von Doxycyclin ins Medium induziert. Die Western-Analyse zeigt, dass alle WWP1-Mutanten ein vergleichbares Expressionsniveau aufweisen und die rekombinanten Proteine bereits nach 6 Stunden nachgewiesen werden können (Abb. 21, B). Durch die rekombinante Expression von WWP1 und den Mutanten wird die weitere Charakterisierung der Interaktion von WWP1 und der RNAPII ermöglicht.

### 3.6.2. Die Interaktion von WWP1 mit der CTD

Die WWP1-Mutanten ermöglichen es, die interagierende Domäne von WWP1 und der RNAPII genauer zu lokalisieren. Hierfür wurde die Expression der rekombinanten WWP1-Proteine in H1299-Zellen für 24 Stunden induziert und anschließend Zellextrakte hergestellt. Alle rekombinanten WWP1-Proteine zeigen ein ähnliches Expressionsniveau (Abb. 22,  $\alpha$ FLAG). Die Zellextrakte wurden mit GST-CTD-Peptiden (52 Wildtyp-Heptad-Wiederholungen) inkubiert und die Bindung von WWP1 untersucht. GST-CTD ko-präzipitiert WWP1 und  $\Delta$ HECT, während  $\Delta$ WW nicht mit der CTD interagiert (Abb. 22, Spur 7-9). Der GST-Tag hat keinen Einfluss auf die Interaktion und präzipitiert WWP1 nicht. Somit kann gezeigt werden, dass WWP1 *in vitro* an die CTD bindet und dass die WW-Domäne für die Bindung an die CTD verantwortlich ist.



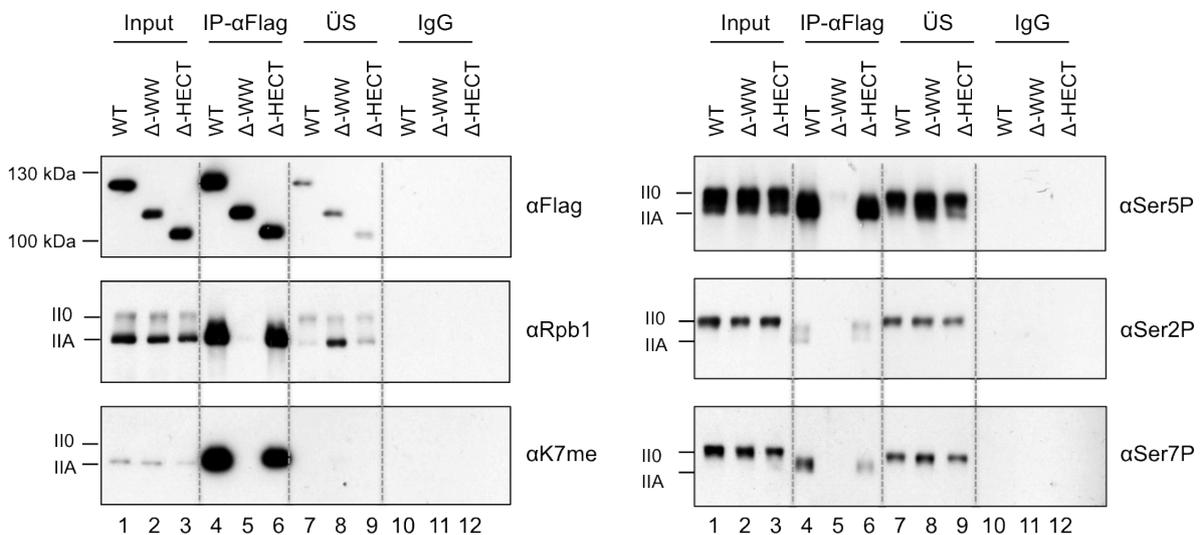
**Abbildung 22: WWP1 interagiert mit der CTD.** Die FLAG-getaggete WWP1-Mutanten wurden aus H1299-Zellextrakten mit GST-CTD-Peptiden präzipitiert. GST ohne CTD diente als Kontrolle für die IP. Die Interaktion der WWP1-Mutanten mit dem GST-CTD-Peptid wurde durch Western-Analysen überprüft. ZE: Zellextrakt; GST: GST-Tag ohne CTD; ÜS: Überstand.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie viele Heptad-Wiederholungen für die Bindung von WWP1 an die CTD benötigt werden. Dazu wurden GFP-CTD-Peptide verwendet, die zwei bis sechs Konsensus-Wiederholungen enthalten. Durch die Western-Analyse kann gezeigt werden, dass bereits kurze CTD-Peptide mit nur zwei Konsensus-Wiederholungen ausreichend sind für eine Interaktion von CTD und



## Ergebnisse

Hierzu wurden die WWP1-Mutanten in H1299-Zellen exprimiert und die rekombinanten Proteine aus Zellextrakten über den FLAG-Tag angereichert. Anschließend wurde die ko-präzipitierte RNAPII hinsichtlich ihrer CTD-Modifikationen untersucht. Der Input zeigt ein vergleichbares Expressionsniveau der WWP1-Mutanten. Weiterhin belegt der Input, dass die Expression der WWP1-Mutanten die CTD-Modifikationen in ihrer Abundanz nicht beeinflusst und das Verhältnis von RNAP IIA- und RNAP II0-Form unverändert bleibt (Abb. 24, Spur 1-3). Konsistent mit den Ergebnissen die mit den CTD-Peptiden generiert wurden, können WWP1 und  $\Delta$ HECT RNAPII präzipitieren, während  $\Delta$ WW auf Grund der fehlenden WW-Domäne nicht mit der RNAPII interagiert (Abb. 24, Spur 4-6). Die Western-Analyse zeigt weiter, dass WWP1 an die hypophosphorylierte RNAP IIA-Form bindet, während RNAP II0 im Überstand verbleibt. Die Überstände der IPs zeigen eine gleichbleibende Reaktivität für die hyperphosphorylierte RNAP II0-Form, wohingegen die Reaktivitäten der RNAP IIA-Form für WWP1 und  $\Delta$ HECT selektiv reduziert sind (Abb. 24, Spur 7-9).



**Abbildung 24: CTD-Phosphorylierungen beeinflussen die Bindung von WWP1 an die CTD.** Die WWP1-Mutanten wurden in H1299-Zellen exprimiert und aus Zellextrakten über den FLAG-Tag präzipitiert. Mittels Western-Analyse wurde die Interaktion von WWP1 mit der RNAPII in Abhängigkeit von den CTD-Modifikationen untersucht.

Die Präferenz von WWP1 mit der RNAP IIA-Form zu interagieren spiegelt sich auch in dem CTD-Modifikationsmuster der präzipitierten RNAPII wieder. WWP1 präzipitiert eine RNAPII, die eine starke Reaktivität für CTD-Lysin7-Methylierung in der Western-Analyse zeigt (Abb. 24, Spur 4,6). Eine deutliche Reaktivität kann auch für die

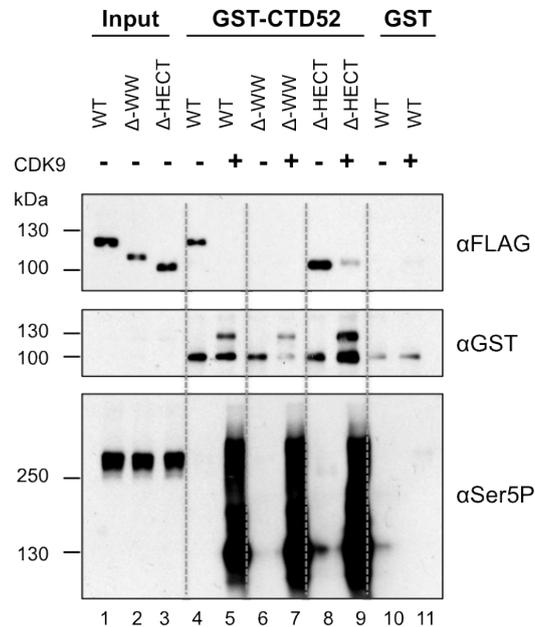
Serin5-Phosphorylierung detektiert werden, wenngleich auffällt, dass vor allem eine Serin5-phosphorylierte RNAP IIA-Form präzipitiert wird. Die Überstandskontrolle weist eine Reduktion der RNAP IIA-Form auf, während die Reaktivität für die RNAP IIO-Form unverändert bleibt (Abb. 23, Spur 4, 6 und 7, 9). Polymerasen die an Serin2 oder Serin7 in der CTD phosphoryliert sind, werden kaum von WWP1 ko-präzipitiert. Die präzipitierten CTD-Serin2- sowie CTD-Serin7-phosphorylierten RNAPII zeigen ein intermediäres Migrationsverhalten im Polyacrylamid-Gel (Abb. 24, Spur 4, 6). Somit konnte bestätigt werden, dass WWP1 bevorzugt mit der RNAP IIA-Form interagiert, die keine oder nur wenige Phosphorylierungen trägt. Ein hoher Phosphorylierungsgrad der CTD scheint auf die Interaktion mit WWP1 inhibitorisch zu wirken. Eine elongierende RNAPII wird daher wahrscheinlich nicht von WWP1 gebunden.

### **3.6.4. CTD-Phosphorylierungen inhibieren die Interaktion von WWP1 und der RNAPII-CTD**

Die vorangegangenen Experimente lassen vermuten, dass CTD-Phosphorylierungen die Interaktion zwischen der CTD und WWP1 negativ beeinflussen können. Diese Annahme soll im Folgenden durch ein *in vitro* Experiment bestätigt werden. Hierzu wurde ein unphosphoryliertes GST-CTD-Peptid mit 52 Heptad-Wiederholungen über einen GST-Antikörper an Sepharose-Kügelchen gebunden, beziehungsweise das GST-CTD vorab mit der CTD-Kinase CDK9 phosphoryliert. CDK9 phosphoryliert die Serine in der CTD an Position zwei und fünf *in vitro* (Devaiah et al., 2012). Mit den phosphorylierten und unphosphorylierten GST-CTD-Peptiden wurden die rekombinanten WWP1-Proteine aus H1299-Zellextrakten präzipitiert und anschließend in der Western-Analyse untersucht. Anhand des Inputs kann zunächst eine gleichmäßige Expression der WWP1-Proteine gezeigt werden (Abb. 25,  $\alpha$ -FLAG, Spur 1-3). Die Phosphorylierung der GST-CTD-Peptide wurde mit einem CTD-Serin5 phosphorylierungsspezifischen Antikörper überprüft. Nach der Kinase-Behandlung zeigt der GST-Western-Blot eine zusätzliche Bande mit einem höheren apparenten Molekulargewicht und die GST-CTD-Peptide sind positiv für die CTD-Serin5-Phosphorylierung (Abb. 25, Spur 5, 7, 9). Mit dem unphosphorylierten GST-CTD-Peptid kann WWP1 und  $\Delta$ HECT präzipitiert werden (Abb. 25,  $\alpha$ FLAG, Spur 4, 8). Das phosphorylierte GST-CTD-Peptid kann  $\Delta$ HECT geringfügig präzipitieren

## Ergebnisse

(Abb. 25,  $\alpha$ FLAG, Spur 9). Mit dem  $\alpha$ -GST-Antikörper wird deutlich, dass CDK9 die GST-CTD-Peptide nicht vollständig phosphoryliert hat. Trotzdem wird die Bindung von WWP1 an das GST-Peptid verhindert.



**Abbildung 25: CTD-Phosphorylierungen inhibieren die Bindung von WWP1 an die CTD.** Die WWP1-Mutanten wurden in H1299-Zellen exprimiert und diese aus Zellextrakten mittels unphosphoryliertem bzw. phosphoryliertem GST-CTD präzipitiert. Ein GST-CTD-Ansatz wurde vor der Präzipitation mit der CDK9 phosphoryliert. Mit Hilfe einer Western-Analyse wurde die Interaktion von WWP1 mit der CTD in Abhängigkeit der Phosphorylierung untersucht.

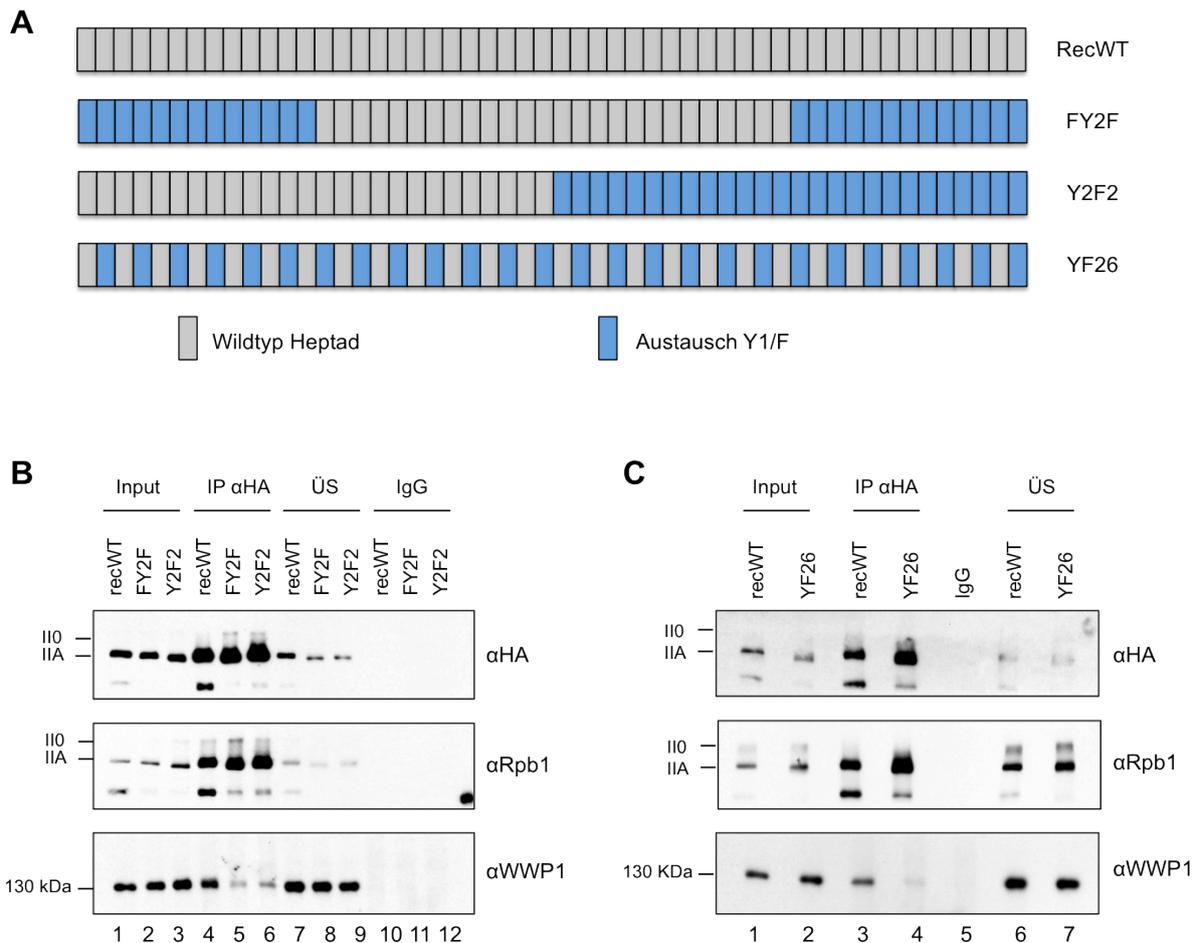
Die *in vitro* Experimente zeigen, dass CTD-Phosphorylierungen die Bindung von WWP1 an die CTD inhibieren und die WW-Domäne von WWP1 nicht-phosphorylierte CTD-Heptade bindet.

### 3.6.5. CTD-Tyrosin1 ist essentiell für die Bindung von WWP1

WW-Domänen binden bevorzugt an prolin/tryrosinreiche Aminosäuresequenzen (Zhi et al., 2012), wie sie sich in der Konsensussequenz der CTD befinden. Deswegen soll nachfolgend überprüft werden, ob CTD-Tyrosin1 für die Bindung von WWP1 an die CTD wichtig ist. Hierfür wurden drei verschiedene CTD-Tyrosin1-Mutanten verwendet, die durch einen partiellen Austausch von Tyrosin1 zu Phenylalanin charakterisiert sind (schematisch in Abbildung 26 A dargestellt). Die blau unterlegten Heptad-Wiederholungen in den Mutanten FY2F, Y2F2 und YF26 haben jeweils eine

## Ergebnisse

Tyrosin1 zu Phenylalanin Substitution und tragen N-terminal einen HA-Tag. Die Expression der Mutanten wurde für 48 Stunden induziert, anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt und Zellextrakte hergestellt. Über den HA-Tag wurden die Polymerasen präzipitiert und ihre Interaktion mit WWP1 untersucht.



**Abbildung 26: Die Bindung von WWP1 an CTD-Tyrosin1-Mutanten.** A) Schematische Darstellung der CTD-Tyrosin1-Mutanten. Entsprechend dem abgebildeten Farbschema besteht die CTD der Mutanten aus Wildtyp-CTD-Heptad-Wiederholungen und CTD-Heptad-Wiederholungen mit einer Tyrosin1/Phenylalanin-Substitution. Die rekombinanten Polymerasen sind N-terminal HA-getaggt. Die Mutanten wurden von Nilay Shah designt und kloniert. B) und C) Ko-Immünpräzipitationen der rekombinanten RNAPII mittels HA-Tag. Die rekombinanten Polymerasen wurden stabil für 48 h in Raji-Zellen exprimiert und die Zellen anschließend für 24 h mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt. Mittels Western-Analyse wurde die Interaktion von WWP1 mit den CTD-Tyrosin1-Mutanten untersucht.

Alle Mutanten zeigen ein vergleichbares Expressionsniveau und beeinflussen die WWP1-Proteinmenge in der Zelle nicht (Abb. 26 B, C). Im Vergleich zum recWT präzipitieren die Mutanten FY2F und Y2F2 deutlich weniger WWP1 (Abb. 26 B,

$\alpha$ WWP1, Spur 4-6). Beide Tyrosin-Mutanten bestehen nur zur Hälfte aus Wildtyp-CTD-Wiederholungen und die Menge an ko-präzipitierten WWP1 ist entsprechend reduziert. Mit der YF26-Mutante können keine nennenswerten Mengen an WWP1 präzipitiert werden (Abb. 26 C,  $\alpha$ WWP1, Spur 3-4). Vorangegangene Experimente zeigen, dass CTD-Peptide mit zwei Heptad-Wiederholungen WWP1 präzipitieren können. Daraus abgeleitet muss das WWP1-CTD-Bindungsmotiv zwei Tyrosine aus benachbarten Heptaden umfassen (Abb. 23). Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass zwei benachbarte Tyrosinreste wichtig für die Bindung von WWP1 sind.

### **3.6.6. WWP1 ubiquitiniert CTD-Peptide *in vitro***

Nach dem die Interaktion von WWP1 mit der CTD gezeigt ist, soll nachfolgend geprüft werden, ob die Lysine im distalen Bereich der CTD ein potentielles Substrat für die Ubiquitinierung durch WWP1 sind. Der Prozess der Ubiquitinierung wird durch das Zusammenwirken von drei verschiedenen Enzymen bewirkt. Das aktivierende Enzym E1 bindet Ubiquitin über ein Cystein und formt eine Thioesterbindung mit der Carboxygruppe des Ubiquitins. Dieser Reaktionsschritt ist ATP-abhängig. Das aktivierte Ubiquitin wird auf das konjugierende Enzym E2 übertragen. Anschließend bindet die E3-Ubiquitin-Ligase über die HECT-Domäne an E2 und überträgt das Ubiquitin auf ein Cystein im C-Terminus der HECT-Domäne, um es auf das Zielprotein zu übertragen (Bernassola et al., 2008). In Säugetierzellen gibt es ein E1-Protein, eine limitierte Zahl von circa 20 E2-Enzymen und etwa 600 E3-Ligasen. Die E3-Ligase vermittelt die Spezifität der Ubiquitinierung und kann nur bestimmte Substrate binden und ubiquitinieren. Gleiches gilt für die Interaktion mit dem E2-Enzym. Die E3-Ligase kann nur mit einer oder wenigen konjugierenden Enzymen interagieren (Pickart, 2001).

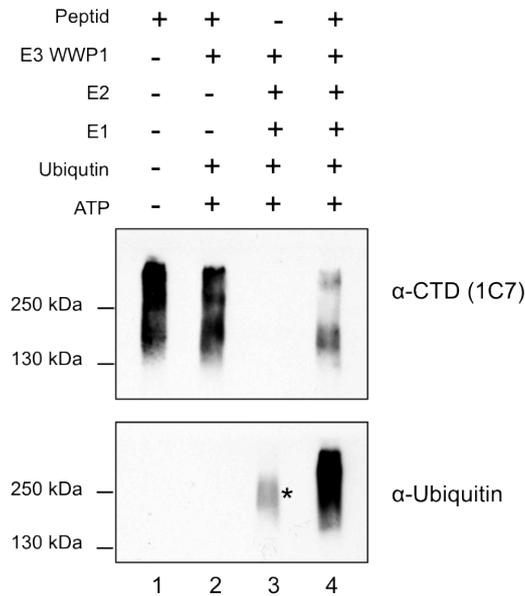
Um zu testen, ob WWP1 die Lysine im distalen Teil der CTD ubiquitinieren kann, wurde ein Peptid synthetisiert, das die CTD-Heptad-Wiederholungen 38-42 umfasst und als Substrat für die *in vitro* Ubiquitinierung dient. Das Peptid CTD 38-42 ist N-terminal an GFP-Protein gekoppelt ist (Abb. 27, A).

## Ergebnisse

**A**

Peptid: CTD 38-42  
 GFP - YTPASPKYSPTSPKYSPTSPKYSPTSPKYSPTSPKYSPTTPK

**B**

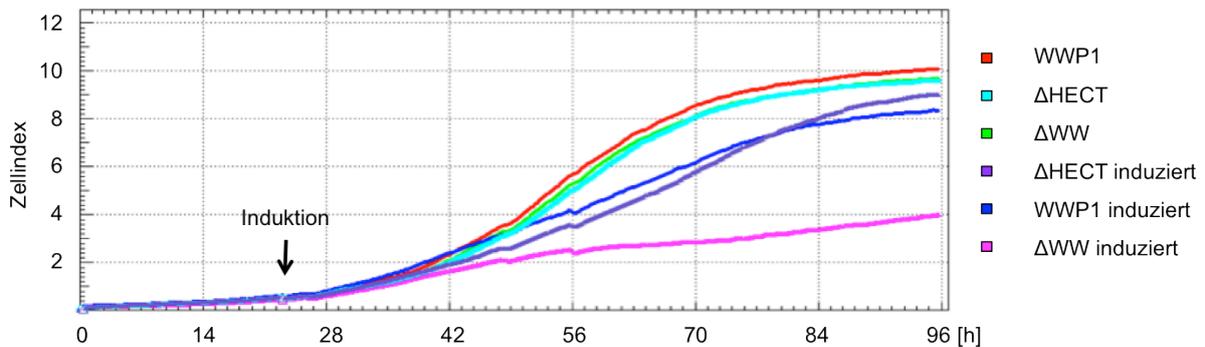


**Abbildung 27: WWP1 ubiquitiniert ein CTD-Peptid *in vitro*.** (A) Aminosäuresequenz des für die *in vitro* Ubiquitinierung verwendeten Peptids CTD 38-42. Das Peptid umfasst die Wildtyp-Aminosäuresequenz der CTD-Heptad-Wiederholungen 38-42 und ist N-terminal GFP-gekoppelt. (B) Aus Zellextrakten wurde die rekombinante WWP1-E3-Ubiquitin-Ligase präzipitiert und über ihren FLAG-Tag eluiert. Die Bestandteile der einzelnen *in vitro* Ubiquitinierungsansätze sind in der Legende über der Western-Analyse indiziert. \* Markiert die Autoubiquitinierung von WWP1.

Mit Hilfe von Literaturrecherche wurde Ubch5c als geeignetes konjugierendes Enzym für WWP1 ausgewählt (Laine et al, 2007). WWP1 wurde in H1299-Zellen exprimiert und über den FLAG-Tag angereichert und gereinigt. Für die *in vitro* Ubiquitinierung wurde das CTD-Peptid mit den einzelnen Komponenten der Ubiquitinierungsreaktion inkubiert. Unvollständige Reaktionsansätze führen zu keiner Ubiquitinierung des CTD-Peptids (Abb. 27, Spur 1, 2). Durch die Autoubiquitinierung von WWP1 kann ein schwaches Ubiquitinierungssignal für einen Reaktionsansatz beobachtet werden, dem nur das Substrat fehlt (Abb. 26, Spur 3). Der vollständige Reaktionsansatz zeigt die stärkste Reaktivität in der Western-Analyse für den  $\alpha$ -Ubiquitin-Antikörper (Abb. 27,  $\alpha$ -Ubiquitin, Spur 4) und zeigt, dass WWP1 ein CTD-Peptid mit Lysinen *in vitro* ubiquitinieren kann.

### 3.6.7. Die Überexpression der $\Delta$ WW-Mutante inhibiert die Zellproliferation

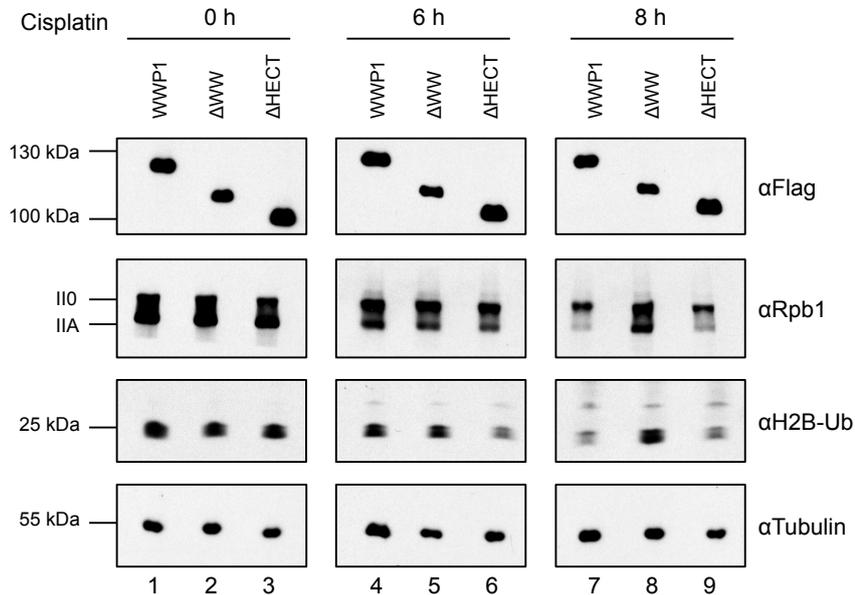
Knockdown-Experimente von WWP1 inhibieren den Zellzyklus und induzieren Apoptose in bestimmten Zelllinien (Cheng et al., 2014, Chen et al., 2007). In circa 40% aller Prostata und Brustkrebstumoren kann eine Amplifikation des WWP1-Gens nachgewiesen werden, was auf ein mögliches onkogenes Potential von WWP1 hindeutet (Chen et al., 2007). Auf Grund dieser Beobachtung soll der mögliche Einfluss der Überexpression der WWP1-Mutanten auf die Zellproliferation untersucht werden. Hierfür wurde das Zellwachstum von H1299-Zellen nach der Expression von WWP1-Konstrukten mit dem xCelligence-System gemessen, dass die elektrische Impedanz ermittelt und daraus die Zelldichte errechnet.



**Abbildung 28: Einfluss der WWP1-Überexpression auf die Zellproliferation.** Messung der Zellproliferation von H1299-Zellen mit dem xCelligence-System. Für die Messungen wurden jeweils 8000 H1299-Zellen ausplattiert und die Expression der rekombinanten WWP1-Proteine 24 Stunden nach dem Anwachsen der Zellen induziert. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus mindestens drei Replikaten dar.

Ohne Expression der WWP1-Konstrukte zeigen die H1299-Zellen ein kongruentes Wachstumsverhalten. Die Expression von WWP1 und  $\Delta$ HECT führt zu einer leichten Verzögerung der Zellteilungsrate (Abb. 28). Eine deutliche Inhibition der Proliferation bewirkt dagegen die Expression von  $\Delta$ WW.  $\Delta$ WW zeigt einen dominant-negativen Phänotyp für die Zellproliferation (Abb. 28).

### 3.6.8. Die Überexpression der $\Delta$ WW-Mutante beeinflusst die Wirkung von Cisplatin



**Abbildung 29: Die Überexpression von  $\Delta$ WW verzögert die Degradation der RNAPII nach Behandlung mit Cisplatin.** Die Expression der rekombinanten WWP1-Proteine wurde für 24 Stunden induziert. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ M Cisplatin bis zu 8 Stunden behandelt und Zellextrakte für die Western-Analyse hergestellt.

DNA schädigende Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Doxorubicin induzieren die Expression von WWP1 in Abhängigkeit von p53 in bestimmten Krebszelllinien (Li et al., 2008). Cisplatin erzeugt DNA-Schäden und bewirkt ein Arretieren der elongierenden RNAPII auf dem Chromatin und ihren Abbau (Ratner et al., 1998). In diesem Zusammenhang soll die Auswirkung der Überexpression von WWP1 auf die RNAPII nach Cisplatin-Behandlung von Zellen untersucht werden. Dafür wurde die Expression der WWP1-Konstrukte für 24 Stunden in H1299-Zellen induziert. Anschließend wurden die Zellen bis zu acht Stunden mit 100  $\mu$ M Cisplatin behandelt und Zellextrakte isoliert, die auf mögliche Auswirkungen von Cisplatin auf die RNAPII sowie die H2B-Histon-Ubiquitinierung (H2B-Ub) untersucht wurden. Die Expression der WWP1-Konstrukte zeigt keinen Einfluss auf die RNAP IIA und RNAP IIO-Form (Abb. 29). Auch die Histon H2B-Ubiquitinierung ist durch die Überexpression der WWP1-Mutanten nicht beeinflusst. Nach sechs Stunden Cisplatin-Behandlung zeigt sich eine vergleichbare Reduktion der RNAP IIA-Form für alle WWP1-Konstrukte und eine leichte Abnahme der H2B-Ub-Signale (Abb. 29, Spur 4-6). Acht Stunden

Cisplatin-Behandlung bewirken einen nahezu kompletten Verlust der RNAP IIA-Form in den Zellen, die WWP1 und  $\Delta$ HECT exprimieren. Diese Abnahme wird nach der Expression von  $\Delta$ WW dagegen nicht beobachtet (Abb. 29, Spur 7-9). Gleiches gilt für die H2B-Ubiquitinierung. Diese nimmt in Zellen die WWP1 und  $\Delta$ HECT exprimieren ab, während sie nach  $\Delta$ WW Expression erhalten bleibt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass  $\Delta$ WW einen globalen Effekt auf den Ubiquitin-Signalweg der Zelle hat. Zum Einem wird die RNAPII unter zellulären Stress verzögert ubiquitiniert und abgebaut und zum Anderen ist auch die De-Ubiquitinierung von H2B-Ub in der Zelle betroffen. Der Abbau von RNAP IIA ist stark nach Überexpression von  $\Delta$ WW verzögert.

## 4. Diskussion

Grundlegend für die Entwicklung eines Organismus und die Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen ist die differenzielle Genexpression. Eine zentrale Rolle spielt dabei die DNA-anhängige RNA-Polymerase II (RNAPII), die sich durch ihre carboxy-terminale Domäne (CTD) von den RNA-Polymerasen abhebt. Durch reversible Modifikationen der CTD können transkriptionelle und ko-transkriptionelle Vorgänge reguliert werden.

In meiner Arbeit konnte ich die Methylierung der Lysine an Position sieben in der CTD als eine weitere Modifikation der CTD beschreiben. Weiterhin konnte ich durch die Analyse des RNAPII-Interaktoms die E3-Ubiquitin-Ligase WWP1 als CTD-Lysin7-ubiquitinierendes Enzym identifizieren.

### 4.1. Erweiterung des CTD-Codes - Die Methylierung des Lysin7 in der CTD

Jeder Aminosäurerest in einer Heptad-Wiederholung der CTD kann reversibel modifiziert werden, wodurch Signaturen geschaffen werden, welche die Rekrutierung von akzessorischen Proteinen steuern. In Anlehnung an den Histon Code wurde ein Modell entwickelt, dass die Modifikationen der CTD einen Code generieren, der die zeitliche Abfolge von ko-transkriptionellen Prozessen wie Capping, Spleißing und Polyadenylierung steuert, aber auch den Transkriptionszyklus beispielweise durch die Interaktion mit dem positiven Transkriptionsfaktor P-TEFb vorantreibt (Buratowski, 2003, Jenuwein, 2001). Die Rolle der einzelnen CTD-Modifikationen für die Transkriptionsregulation wurde in den letzten zwei Dekaden vor allem durch die Etablierung von monoklonalen Antikörpern gegen die posttranslationalen Modifikationen der CTD-Aminosäuren aufgeklärt (Heidemann et al., 2013). In unserer Arbeitsgruppe konnten durch die enge Kollaboration mit der Gruppe um Dr. Kremmer monoklonale Antikörper gegen die phosphorylierten Formen der CTD-Aminosäuren Tyrosin1, Serin2, Threonin4, Serin5 und Serin7 generiert und die Modifikationen *in vivo* nachgewiesen werden (Chapman et al., 2007, Akhtar et al., 2009, Hintermair et al., 2012, Descostes et al., 2014). Nachdem die Modifikationen sowie die Funktionen der Konsensus-Aminosäuren weitestgehend beschrieben wurden, rückten die Nicht-Konsensus-Aminosäuren im distalen Teil der CTD vermehrt in den Fokus. Bisher wurden die Methylierung des Arginin7 in Heptad 31 und die Acetylierung der Lysins7

als funktionale Modifikationen der Nicht-Konsensus-Heptade beschrieben (Sims et al., 2011, Schröder et al., 2013).

Mit dem monoklonalen Antikörper 1F5 konnte ich zeigen, dass Lysin7 in der CTD auch methyliert werden kann. Der Antikörper erkennt die mono- und di-methylierte Form des Lysin7 in der CTD, mit einer Präferenz für die Di-Methylierung. Überraschend ist die höhere Affinität des Antikörpers gegen die di-methylierte Form des Lysins, da der Antikörper gegen ein mono-methyliertes Peptid generiert worden ist. Grundsätzlich basiert die Antigen-Antikörper Erkennung auf dem Schlüssel-Schloss- beziehungsweise dem Anpassungsprinzip (*induced fit*) (Rini et al., 1992). Das bedeutet für den 1F5-Antikörper, dass vermutlich ein mono-methyliertes Lysin von der variablen Region des Antikörpers erkannt und gebunden wird, dass aber nur ein di-methyliertes Lysin eine Konformationsänderung in der Erkennungsregion auslöst und die Antigen-Antikörper-Interaktion verstärkt (Wang et al. 2013). Einige Heptad-Wiederholungen mit einem Lysin7 zeigen weitere Abweichungen von der Konsensussequenz. Somit ist es fraglich, ob der 1F5-Antikörper alle acht Lysin-Reste in der CTD tatsächlich erkennt, oder ob nur Lysin-Reste in den vier Heptad-Wiederholungen 38-40 und 47, die dem zur Immunisierung verwendeten Peptid am ähnlichsten sind, erkannt werden. Mit dem 1F5-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die hypophosphorylierte RNAP IIA-Form eine Lysin7-Methylierung trägt. Weiterhin zeigen Ko-Immünpräzipitationsexperimente, dass die Lysin7-Methylierung mit anderen Modifikationen in der CTD gleichzeitig auftritt. Der 1F5-Antikörper präzipitiert Polymerase-Populationen die eine schwache Reaktivität für die CTD-Phosphorylierungen zeigen und durch ein intermediäres Migrationsverhalten im Polyacrylamid-Gel zwischen der RNAP IIA und RNAP II0-Form charakterisiert sind. Ein intermediäres Laufverhalten deutet auf Polymerasen hin, die nur wenige Phosphorylierungen in der CTD tragen, wie sie zu Beginn und am Ende des Transkriptionszyklus zu erwarten sind.

Die Massenspektrometrie ermöglicht einen viel differenzierteren Einblick in das Modifikationsspektrum der RNAPII-CTD, als es mit monoklonalen Antikörpern möglich ist, auch wenn diese für die molekularbiologische Forschung von unverzichtbarem Wert sind. Durch die massenspektrometrische Analyse der distalen CTD konnte bestätigt werden, dass die Lysine an Position sieben in der CTD mono-, di- und tri-methyliert sein können. Somit konnten alle drei möglichen Methylierungszustände sowie die Acetylierung des Lysins in der CTD

massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Keine Modifikationen konnten an den Lysinen in den Heptaden 35 und 45 nachgewiesen werden. Unklar ist, inwiefern dieses Ergebnis auf technische Ursachen zurückzuführen ist, wenngleich die nicht modifizierten Peptide detektiert wurden. Möglich wäre, dass diese Lysine von der Acetylierung und Methylierung ausgenommen sind und nicht oder anders modifiziert werden, zum Beispiel durch Ubiquitinierung oder Sumoylierung.

Die Erweiterung des CTD-Codes durch die Methylierung und Acetylierung der Lysin7-Reste in der CTD führt zu neuen Fragen. Evolutionär konservierte Domänen, wie Chromo, Bromo oder MBT interagieren spezifisch mit acetylierten, beziehungsweise methylierten Lysin-Resten und könnten Ko-Aktivatoren oder – Repressoren mit diesen Bindungsdomänen an den Transkriptionskomplex dirigieren. Unklar ist, ob Proteine mit diesen Domänen auch über die Lysin7-Modifikationen rekrutiert werden.

Ebenfalls von großem Interesse sind die Enzyme, die für die Methylierung und Demethylierung der Lysine in der CTD verantwortlich sind. Denkbar wäre, dass Histonmethyltransferasen während des Transkriptionszyklus an die CTD rekrutiert werden und neben den Histonschwänzen auch die CTD methylieren. Die Arginin-Methyltransferase CARM1 methyliert nicht nur das Arginin1810 in der CTD, sondern ist gleichzeitig auch eine Histonmethyltransferase für das Arginin 17 sowie 26 in Histon 3 (Sims et al., 2011, Ma et al., 2001). Da die Lysine in der CTD sehr früh im Transkriptionszyklus methyliert werden, könnte die Rekrutierung des COMPASS-Komplexes während der Transkriptionsinitiation synergistische Funktionen haben. Neben der Methylierung von H3K4 könnten die Lysine in der CTD ein weiteres Substrat für den COMPASS-Komplex sein. Im Vergleich zur Hefe besteht der humane COMPASS-Komplex aus mehreren Set1-Homologen und enthält die Methyltransferasen MLL1-4 sowie hSet1A und hSet1B. Während im Hefe-COMPASS-Komplex nur Set1 H3K4 methylieren kann, besitzen die Säuger somit sechs verwandte Methyltransferasen, die diese Funktion teilen (Shilatifard 2008). Dennoch sind die H3K4-Methyltransferasen in Säugern nicht redundant. Die Deletion von MLL1 und/oder MLL2 ist in embryonalen Mausstammzellen letal (Yu et al., 1995, Lubitz et al 2007). Gleichzeitig ist es nicht auszuschließen, dass mehrere Methyltransferasen das Lysin7 in der CTD methylieren können, vergleichbar mit H3K4. H3K4 wird nicht nur vom COMPASS-Komplex methyliert, sondern auch von

Set7. Set7 fügt in der Regel eine Mono-Methylierung an H3K4 an und methyliert auch Nicht-Histon-Proteine wie p53 oder pRB (Binda, 2013).

### 4.2. Das Zusammenspiel von K7-Methylierung und -Acetylierung

Genomweite Untersuchungen der RNAPII-Verteilung haben eine Korrelation der unterschiedlichen CTD-Modifikationen mit den einzelnen Phasen des Transkriptionszyklus belegt (Hintermair et al., 2012, Descostes et al., 2014). Gut charakterisiert ist die gegenläufige Verteilung der Serin5- und Serin2-Phosphorylierung in der CTD während der Transkription eines Gens. Am Transkriptionsstart (TSS) ist die Serin5-Phosphorylierung wichtig, damit sich die RNAPII vom Promotor lösen kann und akzessorische Komplexe rekrutiert werden. Durch Dephosphorylierung der Serin5-Reste nach der TSS und der gleichzeitigen Phosphorylierung von Serin2, kommt es zur Zunahme dieser Modifikation am 3' Ende der Gene. Die Serin2-Phosphorylierung übernimmt am 3'Ende wichtige Funktionen bei der Koordination der 3'Prozessierung und der Termination (Egloff et al., 2008). Ein ähnliches Wechselspiel scheint zwischen der CTD-Lysin7-Methylierung und -Acetylierung an der Promotorregion denkbar. Die genomweite Verteilung zeigt die Lysin7-Methylierung am stärksten im Bereich der TSS, eine weitere leichte Anreicherung wird am 3'Ende der Gene gefunden. Im Vergleich dazu zeigt die Lysin7-Acetylierung ihr Maximum nach der TSS, im Bereich des Promotorproximalen Transkriptionsarrests und nimmt Richtung 3'Ende der Gene wieder ab (Schröder et al., 2013).

Lysine im distalen Bereich der CTD sind ein Charakteristikum von höheren Eukaryonten. In *S. cerevisiae* und *S. pombe* kommen dagegen keine Lysine in der CTD vor. Die CTD von *Drosophila* enthält drei und von Säugetieren acht Lysine-Reste (Abb. 1). Mit der Evolution komplexer Organismen wurden gleichzeitig neue genregulatorische Mechanismen entwickelt, die eine schnelle, adaptive Reaktion auf zelluläre Reize optimiert haben. In den vergangenen Jahren konnte vor allem durch die Etablierung der Chromatin-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass das Prinzip des Promotorproximalen Transkriptionsarrests in höheren Eukaryonten weit verbreitet ist. Hierbei stoppt die RNAPII kurz nach der TSS, vermittelt durch DSIF und NELF, um akzessorische Proteinkomplexe rekrutieren zu können. Besonders bei den unmittelbar frühen Genen, die nach externen Stimuli sofort exprimiert werden,

verharrt die RNAPII bereits an der TSS, um als Reaktion auf einen Reiz direkt in die produktive Elongation übergehen zu können (Adelman und Lis, 2012). Die unmittelbar frühen Gene *c-MYC* und *FOS* sind Zielgene der EGF- (epidermaler Wachstumsfaktor) Signaltransduktionskaskade. EGF induzierte Wachstumsregulation wird nur in höheren Eukaryonten gefunden (Schneider und Wolf, 2006). Die EGF induzierte Genexpression der unmittelbar frühen Gene ist in CTD-Mutanten mit einer Lysin-/Arginin-Substitution defekt, während andere, konstitutiv exprimierte Gene nicht in ihrer Expression beeinflusst werden. Daraus ergibt sich für die Lysin7-Acetylierung eine spezifische Funktion bei der Regulation von Genen, die durch Wachstumsfaktoren induziert werden (Schröder et al., 2013).

Auf Grundlage der Daten die mit der ChIP und der Massenspektrometrie gewonnen wurden, könnte die Lysin7-Methylierung der CTD ein Gegenspieler der Lysin-Acetylierung sein. Ein mögliches Modell wäre, dass die Lysine in der CTD an der TSS mono-methyliert sind, um eine vorzeitige und übermäßige Acetylierung zu verhindern. Untermuert wird dies durch die starke Präsenz der methylierten RNAPII am Promotor, wobei das ChIP-Profil keine Differenzierung zwischen der Mono- und Di-Methylierung erlaubt. Die Massenspektrometrie liefert hier weitere Hinweise, dass am Transkriptionsstart vermutlich primär nicht modifizierte beziehungsweise mono-methylierte Lysine vorliegen. Nur Peptide mit einer Lysin Mono-Methylierung werden ohne Phosphorylierungen gefunden.

Wenn die RNAPII den Promotor verlässt, werden die Lysine in der CTD teilweise durch die Histonacetyltransferase p300 acetyliert. Die Acetylierung vermittelt den Promotor-proximalen Transkriptionsarrest und verhindert eine vorzeitige Phosphorylierung der distalen Heptade in der CTD (Schröder et al., 2013). Voraussetzung hierfür ist, dass einige Lysine nach der TSS demethyliert werden beziehungsweise, dass nicht modifizierte Lysine acetyliert werden. Ein weiterer Grund für die verstärkte Abnahme der Lysin7-Methylierungssignale unterhalb der TSS könnte die verstärkte Serin5-Phosphorylierung in der CTD sein, die das Epitop des 1F5-Antikörpers maskiert. Anhand der Massenspektrometrie-Daten wird deutlich, dass in den einzelnen Heptaden das volle Phosphorylierungspotential nicht ausgenutzt wird. Zumeist zeigen die Heptade ein bis zwei Phosphorylierungen, wodurch eine mögliche Maskierung des Epitops durch benachbarte Modifikationen nicht maßgeblich die ChIP-Profile beeinflussen sollte. Die Tri-Methylierung des Lysin7 in der CTD wird von dem 1F5-Antikörper nicht erkannt und spiegelt sich somit

nicht in dem ChIP-Profil wider. Peptide mit einer Tri-Methylierung sind tendenziell mehrfach phosphoryliert und müssen somit einer elongierenden RNAPII zugeordnet werden. Am 3'Ende nehmen die Signale für die Lysin7-Methylierung im ChIP-Profil reziprok zu Acetylierung leicht zu.

Zusammenfassend könnte der Lysin7-Methylierung eine aktivierende Funktion im Transkriptionszyklus zukommen indem sie eine vorzeitige Acetylierung der CTD verhindert, wodurch der Promotor-proximale Transkriptionsarrest auslöst wird. Somit könnte der Wechsel zwischen Methylierung und Acetylierung der Feinregulation einer genklassenspezifischen Start-Stopp-Funktion in der Transkription gleichkommen.

### **4.3. Con 48 – Die Reduktion auf das Wesentliche**

Die CTD einfacher und höherer Eukaryonten unterscheidet sich in der Anzahl der Heptad-Wiederholungen. Mit zunehmender Komplexität der Lebewesen steigt aber auch die Zahl der Heptad-Wiederholungen die von der Konsensussequenz YSPTSPS abweichen. Die CTD von Drosophila enthält nur zwei Heptade mit der Konsensussequenz. Dennoch ist der Aufbau aus Tandemwiederholungen erhalten geblieben und verdeutlicht, dass die repetitive Struktur der CTD wichtig ist (Corden, 2013). In Zellkultur-Zellen von Säugern wird der Austausch von Nicht-Konsensus zu Konsensus-Aminosäuren toleriert. Die Con48-Mutante zeigt in B-Zellen eine leicht reduzierte Zellproliferation und Zellviabilität (Chapman et al., 2005), während in transient transfizierten HEK293-Zellen die Expression von Con48 keine Auswirkung auf die Zellproliferation hat (Hintermair et al., 2012). Somit können alle wesentlichen Funktionen in der Zelle durch die Con48-Polymerase unterstützt werden und weisen darauf hin, dass die Nicht-Konsensus-Aminosäuren nicht essentiell für das Zellwachstum sind. Die Nicht-Konsensus-Aminosäuren scheinen vielmehr genklassenspezifische Funktionen bei der Expression von kleinen RNAs und Wachstumsfaktor-abhängiger Gene zu haben (Sims et al., 2011, Schröder et al., 2013). Eine Polymerase die nur Nicht-Konsensus-Heptade in der CTD enthält, ist für Zellen hingegen letal und ein Hinweis, dass die Konsensus-Heptade für grundlegende Funktionen während der Transkription verantwortlich sind. Der Austausch von Konsensus-Heptaden zu Nicht-Konsensus-Aminosäuren wird nicht toleriert. Die Labore von Stiller und Corden haben durch genetische Manipulation der

CTD wichtige Beiträge zur Funktionsanalyse der Aminosäuren in Konsensus-Heptaden in der Hefe gemacht. Eine Substitution der Serine an Position zwei oder fünf zu Alanin oder Glutaminsäure ist in *S. cerevisiae* letal, ebenso wie der Austausch von Serin7 zu Glutaminsäure (West et al., 1995, Zhang et al., 2012). Das Ersetzen von Tyrosin1 durch Phenylalanin erzeugt einen letalen Phänotyp in *S. cerevisiae*, nicht aber in *S. pombe* (West et al., 1995, Schwer et al., 2001). Im Gegensatz zu Säugerzellen ist die Substitution von Threonin4 oder Serin7 in der CTD zu Alanin in *S. cerevisiae* nicht letal (Stiller et al., 2000, Hintermair et al., 2012). Diese Analysen deuten darauf hin, dass die Con48 alle wichtigen Aminosäuren enthält. Möglich wäre aber, dass die Con48-Mutante Defizite unter Stress zeigt, wie es in der Hefe für die Threonin4 oder Serin7 zu Alanin-Mutanten beschrieben ist (Schwer et al., 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich durch eine vergleichende Western-Analyse mit phosphorylierungsspezifischen CTD-Antikörper zeigen, dass alle CTD-Phosphorylierungen in recWT und Con48 vergleichbar präsent sind. In Con48 wird nur eine leichte Akkumulation der Threonin4-Phosphorylierung beobachtet.

Durch eine vergleichende Analyse mittels Massenspektrometrie konnten keine Unterschiede im Interaktom vom recWT und Con48 identifiziert werden. Dieses Ergebnis könnte einerseits darauf hindeuten, dass vor allem die Aminosäuren der Konsensussequenz für die Bindung an akzessorische Proteine verantwortlich sind. Andererseits bleibt unklar ob das System sensitiv genug war, um kleine Unterschiede zu identifizieren. Die bisher beschriebenen Funktionen von Modifikationen der Nicht-Konsensus-Aminosäuren sind sehr speziell. Möglich wäre, dass die Expression von recWT und Con48 in unterschiedlichen Geweben zu anderen Ergebnissen führen würde. Ein weiterführender und sensitiverer Ansatz wäre die SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)-Methode. Bei der SILAC-Methode würde eine Mutante mit einem Nährmedium kultiviert werden, das eine Aminosäure mit einem schweren Isotop, wie ein Arginin  $^{13}\text{C}$ , enthält. Dadurch werden alle  $^{13}\text{C}$ -Arginin enthaltenden Peptide schwerer im Vergleich zum Wildtyp. Die gleichzeitige massenspektrometrische Analyse von einer markierten und nicht markierten Probe ermöglicht quantitative Aussagen über die identifizierten Peptide. Mit der SILAC-Methode könnte nicht nur dargestellt werden, ob ein Protein mit der RNAPII interagiert, sondern auch ob interagierende Proteine die Mutante besser beziehungsweise schlechter binden.

Abschließend wird deutlich, dass die Konsensus-Aminosäuren für die Viabilität der Zelle ausreichend sind und die Nicht-Konsensus-Aminosäuren vermutlich für die Feinregulation der RNAPII und Stressantwort von Bedeutung sind.

#### 4.4. Das Interaktom der RNAPII

Die massenspektrometrische Analyse des RNAPII-Interaktoms offenbart die große Vielfalt von Proteinen, die mit der RNAPII interagieren. Neben einzelnen Faktoren wurden vor allem große Proteinkomplexe wie der Mediator, der Integrator und das Proteasom massenspektrometrisch als RNAPII-Interaktionspartner identifiziert.

Dem Mediator-Komplex fehlt allerdings das Kinase-Modul bestehend aus den Untereinheiten Cdk8, CycC, Med12 und Med13 (Zhu et al., 2006). Mediator-Subkomplexe wurden in der Vergangenheit oft gereinigt und beschrieben (Malik et al., 2000, Taatjes et al., 2002, Wang et al., 2001). Das Kinase-Modul scheint die Affinität des Mediators an die RNAPII zu beeinflussen. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass der Mediator-Komplex ohne das Kinase-Modul an immobilisierte GST-CTD-Peptide bindet, nicht aber mit dem Kinase-Modul (Naar et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden durch MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) Analysen des Mediators erzielt. Die Anreicherung des Mediator-Komplexes über die Kinase-Untereinheit Cdk8 zeigte, dass kaum RNAPII mit diesem Komplex assoziiert ist (Conaway et al., 2005). Eine Präzipitation über die Med26-Untereinheit führt zur Akkumulation von Mediator-Komplexen mit wenigen Kinasen, ermöglicht aber eine nahezu stöchiometrische Ko-Präzipitation der RNAPII (Sato et al., 2004). Die Mediator Kinase Cdk8-Cyclin C kann den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIH durch Phosphorylierung der Cyclin H Untereinheit inaktivieren. TFIIH phosphoryliert während der Initiation die CTD an den Serin5-Resten, damit die RNAPII vom Promotor dissoziieren und in die Elongation übergehen kann. Über das Kinase-Modul wird dem Mediator so eine repressive Wirkung auf die Transkription verliehen (Akoulitchev et al., 2000).

Vergleichbar mit dem Mediator konnte auch ein nahezu vollständiger Integrator-Komplex assoziiert mit RNAPII detektiert werden. Der Integrator-Komplex besteht aus 12 Untereinheiten und ist für die 3'Prozessierung von snRNA wichtig. Nur die Untereinheit INTS10 konnte ich in meinen massenspektrometrischen Analysen nicht identifizieren. Gründe für das Fehlen der INTS10-Untereinheit könnten in einer

kurzen Halbwertszeit des vollständig assemblierten Komplexes liegen oder darin dass der vollständige Komplex nur an snRNA-Gene rekrutiert wird.

Weiter wurde eine Reihe von Chaperonen mit der RNAPII assoziiert gefunden. Chaperone helfen Proteinen bei der Ausbildung der korrekten Faltung und Assemblierung. Prefoldin ist ein Chaperon-Komplex der in Archaeen und Eukaryonten vorkommt, nicht aber in Bakterien. Strukturell ist der kanonische Prefoldin-Komplex ein Hexamer aus zwei Alpha- sowie vier Beta-Untereinheiten. Der Prefoldin-Komplex ist an der ko-translationalen Faltung von Proteinen wie Tubulin und Aktin beteiligt, indem er die ungefalteten Polypeptide den zytosolischen Chaperoninen präsentiert (Martin-Benito et al., 2002, Simons et al., 2004). Neben dem kanonischen Prefoldin-Komplex ist auch ein nicht-kanonischer Prefoldin-Komplex beschrieben, den ich in der Massenspektrometrie vollständig mit der RNAPII assoziiert gefunden habe. Der nicht-kanonische Prefoldin-Komplex besteht aus den sechs Untereinheiten URI, PDRG1, PFDN2, PFDN6, UXT und WDR92 und interagiert mit dem Ko-Chaperon-Komplex R2TP, der ebenfalls mit der RNAPII assoziiert ist (Millan-Zambrano et al., 2014). R2TP besteht aus den vier Proteinen PIH1D1, RPAP3, RUV1 und RUV2 (Kakihara et al., 2012). Die Assemblierung der RNAPII im Zytoplasma wird durch den R2TP-Komplex unterstützt (Boulon et al., 2010). In der Hefe konnte gezeigt werden, dass der Prefoldin-Komplex auch im Zellkern präsent ist und Teile des kanonischen Prefoldin-Komplexes transkriptionsabhängig ans Chromatin rekrutiert werden. Der Prefoldin-Komplex hat einen positiven Einfluss auf die Elongationsrate der RNAPII und scheint an der ko-transkriptionellen Entfernung der Histone beteiligt zu sein (Millan-Zambrano et al., 2013).

Proteine die nicht richtig gefaltet werden oder die ihre Funktionalität verloren haben, werden in der Zelle durch Polyubiquitinierung für den Abbau durch das Proteasom markiert. Die Ubiquitinierung erfolgt an Lysin-Resten durch E3-Ubiquitin-Ligasen. Durch die massenspektrometrische Analyse des RNAPII-Interaktoms wurden diverse Ubiquitin-Ligasen (ITCH, WWP1, WWP2, STUB1) sowie das Proteasom mit der RNAPII assoziiert gefunden. Während der Transkription kann die RNAPII zum Beispiel auf Grund von quervernetzten Basen oder anderen DNA-Läsionen blockiert werden (Kireeva et al., 2005, Svejstrup, 2002, Donahue et al., 1994). Der Transkriptions-Elongationskomplex ist sehr stabil, um die Transkription langer Gene zu ermöglichen. Daraus ergibt sich das Problem, dass eine gestoppte RNAPII nicht

von der DNA-Matrize dissoziieren kann und nachfolgende RNA-Polymerasen bei der Transkription des Gens behindert werden. Die meisten DNA-Läsionen werden deswegen direkt durch die transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert (Svejstrup, 2002). Die durch NER entfernte RNAPII wird polyubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Ratner et al., 1998). In humanen Zellen scheint NEDD4 im Komplex mit Elongin A/B/C, Cul5 und Rbx2 für die Ubiquitinierung von Rpb1 verantwortlich zu sein (Anindya et al., 2007, Kamura et al., 2001, Harreman et al., 2009). Die Analyse des RNAPII Interaktoms legt nahe, dass Rpb1 Ziel von verschiedenen E3-Ubiquitin-Ligasen ist. Denkbar ist, dass verschiedene E3-Ligasen die Ubiquitinierung von Rpb1 in Abhängigkeit von unterschiedlichem zellulären Stress vermitteln können.

### **4.5. Die Interaktion von WWP1 mit der RNAPII**

Die Ubiquitinierung bedarf der Aktivität von drei Enzym Klassen: dem Ubiquitin aktivierenden Enzym (E1), dem Ubiquitin konjugierenden Enzym (E2) und der Ubiquitin-Ligase (E3). Als letzten Schritt der Ubiquitinierungs-Kaskade übertragen die E3-Ligasen Ubiquitin kovalent auf einen Lysin-Rest im Zielprotein. Das menschliche Genom kodiert für etwa 600 E3-Ligasen, die für die Substratspezifität verantwortlich sind (Li et al., 2008). Unterteilt werden die E3-Ligasen in die große Gruppe der RING-Ligasen und einer kleinen, nur 28 Enzyme umfassenden Gruppe der HECT-Ligasen. Die RING-Ligasen haben keine intrinsische Ligase-Aktivität, sondern eskortieren das Substratprotein zu einem E2-Enzym das für den Ubiquitin-Transfer verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu verfügen die HECT-Ligasen über eine intrinsische Ligase-Aktivität und übertragen das aktivierte Ubiquitin direkt auf das Zielprotein. Innerhalb der HECT-Ligasen ist die Untergruppe der Nedd4-Superfamilie beschrieben. Hierzu gehören unter anderem die Enzyme WWP1, WWP2, Smurf1 und ITCH. Gemeinsam ist dieser Gruppe der Aufbau aus einer C2-Domäne, zwei bis vier WW-Domänen und einer HECT-Domäne (Chantry, 2011). Die WW-Domäne ist nach zwei konservierten Tryptophanen benannt und als potentielle RNAPII CTD-Interaktionsdomäne beschrieben. Über eine WW-Domäne bindet auch die Peptidyl-Prolyl-Isomerase Pin1 an die CTD und isomerisiert die Proline in den Heptaden. Pin1 interagiert mit prolin-reichen Aminosäuresequenzen, die zusätzlich über phosphorylierte Serine oder Theonine verfügen (Zhang et al., 2012).

Die Analyse der massenspektrometrischen Daten belegen die Assoziation von drei HECT-E3-Ligasen WWP1, WWP2 und ITCH mit der RNAPII. WWP2 wurde bereits als CTD E3-Ligase in embryonalen Mausstammzellen beschrieben (Li et al., 2007). In meiner Arbeit habe ich die Interaktion von WWP1 mit der RNAPII detailliert untersucht und gefragt, ob die acht Lysine im distalen Bereich der CTD auch ein Substrat für WWP1 sein könnten. Durch Ko-Immünpräzipitations-Analysen von WWP1 mit der recWT- und Con48-Polymerase konnte ich zeigen, dass die Bindung von WWP1 an die CTD unabhängig von Nicht-Konsensus-Aminosäuren erfolgt. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse der Massenspektrometrie-Experimente, dass WWP1 auch an Con48 bindet. Im Gegensatz zu Pin1 bevorzugen WWP1 und auch WWP2 die Bindung an die hypophosphorylierte RNAPII. Während für WWP2 auch eine schwache Bindung an die hyperphosphorylierte RNAPII beschrieben ist (Li et al., 2007), kann dies für WWP1 nicht bestätigt werden. WWP1 bindet stark an die RNAP IIA-Form und präzipitiert mit einer RNAPII-Subfraktion, die zwischen der RNAP IIA und RNAP II0-Form im Polyacrylamid-Gel wandert. Interessanterweise werden Polymerasen mit einer CTD-Lysin7-Methylierung besonders stark präzipitiert, was darauf hindeutet, dass WWP1 schon früh im Transkriptionszyklus mit der RNAPII interagieren muss und dass die Lysin-Methylierung die RNAPII in dieser Phase der Transkription vor einer Ubiquitinierung protektieren könnte. Somit scheint eine elongierende, stark phosphorylierte RNAPII nicht Ziel von WWP1 zu sein. Neben dem Phosphorylierungszustand der CTD ist das Tyrosin1 ein wichtiger Teil des von WWP1 erkannten Aminosäuremotivs. Die partielle Substitution von Tyrosin1 zu Phenylalanin führt zu einer reduzierten Bindung von WWP1 und eine Tyrosin-Substitution in jedem zweiten Heptad verhindert die Bindung von WWP1 an die CTD. Unter der Berücksichtigung, dass zwei Heptade ausreichend sind, um WWP1 zu präzipitieren sollte das Erkennungsmotiv von WWP1 mindestens zwei Tyrosine aus benachbarten Heptaden umfassen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Analysen zur minimalen funktionalen Einheit der CTD in der Hefe. Die Insertion von einem Alanin nach jedem Heptad führt zu einem letalen Phänotyp, während die Insertion nach jedem zweiten Heptad toleriert wird. Daraus abgeleitet ergibt sich, dass die funktionale Einheit der CTD in einem Heptadpaar liegen muss (Stiller und Cook, 2004). Stiller und Cook fanden weiter, dass insbesondere die Aminosäuren S<sub>2</sub>-S<sub>5</sub>-S<sub>9</sub> und zwei Tyrosine im Abstand von sieben Aminosäuren für die Funktionalität der CTD essentiell sind. Daraus entwickelten sie die 252-Mutante

(Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub>Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>), mit der sie die funktionale Einheit der CTD noch weiter eingrenzen konnten. Die 252-Mutante zeigt ein normales Wachstum und ist durch das Fehlen der letzten drei Aminosäuren (S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub>) in jedem zweiten Heptad charakterisiert (Liu et al., 2010). Möglich wäre, dass die von Stiller und Cook identifizierte funktionale Einheit der CTD dem Erkennungsmotiv der WW-Domäne von WWP1 gleich kommt.

#### 4.6. WWP1 eine Rpb1 E3-Ubiquitin-Ligase

Die E3-Ligase WWP1 kann ein CTD-Peptid *in vitro* ubiquitinieren und ist *in vivo* unabhängig von zellulärem Stress mit der RNAPII assoziiert. Gleiches gilt für die WWP2 und führt zu der Vermutung, dass die Funktion des Hefe-Homolog Rsp5 im Menschen durch mehrere Ubiquitin-Ligasen erfüllt werden kann. In der Hefe ist Rsp5 die einzige beschriebene HECT-Ligase und ihre Inaktivierung führt zu einem reduzierten proteasomalen Abbau der RNAPII nach DNA-Schäden (Huibregtse et al., 1997, Harreman et al., 2009).

Im Menschen kann die HECT-E3-Ligase NEDD4 Rpb1 ubiquitinieren, wenn diese im Komplex mit Elongin/Rbx1/Cullin5 vorliegt. Ohne den Elongin/Cullin-Komplex kann NEDD4 die CTD nicht nennenswert ubiquitinieren (Harreman et al., 2009). WWP1 und WWP2 benötigen im Vergleich zu Nedd4 keine zusätzlichen Faktoren, um die CTD zu ubiquitinieren. Somit sind bereits drei E3-Ligasen der NEDD4-Superfamilie als Rpb1-Ubiquitin-Ligasen beschrieben. Es ist zu erwarten, dass noch weitere E3-Ligasen dieser Proteinfamilie wie ITCH und Smurf die RNAPII ubiquitinieren können. Die Assoziation von ITCH mit der RNAPII konnte ich durch die Massenspektrometrie bereits zeigen und ist ein weiterer Hinweis, dass die Ubiquitinierung der RNAPII in Säugern durch mehrere E3-HECT-Ligasen katalysiert werden kann.

Kürzlich wurde gezeigt, dass WWP1 und WWP2 Heterodimere ausbilden und dadurch die Substratspezifität modifiziert werden kann. Der Transkriptionsfaktor p73 induziert Apoptose und Zellzyklusarrest nach zellulären Stress (Zhu et al., 1998, Jost et al., 1997). Reguliert wird die p73 Proteinmenge indem es durch WWP1 und WWP2 ubiquitiniert wird und p73 durch das Proteasom abgebaut wird. p73 existiert in verschiedenen Isoformen. Der verkürzten Isoform  $\Delta$ Np73 fehlt die Transaktivierungsdomäne und sie besitzt einen dominant-negativen Phänotyp für die Funktion von p73. WWP2 kann nur p73 ubiquitinieren und WWP1 nur  $\Delta$ Np73.

Interessanterweise kann WWP1  $\Delta$ Np73 nur effizient ubiquitinieren, wenn es in einem heterodimeren Komplex mit WWP2 vorliegt. Die Assemblierung des heterodimeren Komplexes aus WWP1 und WWP2 wird durch die Phosphatase PPM1G reguliert. Eine Inhibierung der Phosphatase verhindert die Heterodimerisierung der E3-Ligasen. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die CTD denkbar und könnte erklären, warum die Ubiquitinierung von Rpb1 durch mehrere E3-Ligasen erfolgt (Chaudhary und Maddika, 2014).

Die Arbeitsgruppe Jin konnte durch die massenspektrometrische Analyse von GST-CTD-Peptiden zeigen, dass WWP2 sechs der acht Lysine in der CTD *in vitro* ubiquitinieren kann. Keine Ubiquitinierung konnte an den Lysinen in den Heptaden 35 und 49 nachgewiesen werden (Li et al., 2007). Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Lysin-Resten der CTD die methyliert und acetyliert werden. Daher könnte die CTD-Methylierung möglicherweise eine kompetitive Wirkung auf andere Lysin-Modifikationen wie die Acetylierung und die Ubiquitinierung haben.

#### **4.7. Der dominant-negative Phänotyp der $\Delta$ WW-Mutante**

WWP1 wird ein onkogenes Potential zugesprochen, da diese E3-Ligase den Tumorsuppressor TGF $\beta$  negativ reguliert und einzelne molekulare Komponenten der TGF $\beta$ -Signaltransduktions-Kaskade, wie Smad2 und T $\beta$ R1, inaktivieren kann. Zudem ist die WWP1-Expressionsrate in fast 40% aller Brust- und Prostata-Tumoren erhöht (Chen et al., 2007). In Leberzellen führt der Knockdown von WWP1 zu Wachstumsdefekten und induziert Apoptose durch die Aktivierung von Caspase3 und p53 (Cheng et al., 2014).

Wie in Abbildung 28 gezeigt, führt die Überexpression von WWP1 und  $\Delta$ HECT in H1299-Lungenkarzinom-Zellen zu einer leichten Reduktion der Zellproliferation. Zu einer deutlichen verminderten der Zellteilungsrate führt dagegen die Expression von  $\Delta$ WW. Durch die Expression von  $\Delta$ WW könnte die Ubiquitin-Homöostase in der Zelle betroffen sein. Die  $\Delta$ WW-Mutante kann durch die fehlende WW-Domäne nicht mit dem Substrat-Protein interagieren, könnte aber ein aktiviertes Ubiquitin auf die intakte HECT-Domäne übertragen und dadurch den Pool an freiem Ubiquitin in der Zelle leeren. Ubiquitin-Homöostase wird in der Zelle durch das Zusammenwirken von Expressionsregulation der Ubiquitin-Gene, -Proteasen und -Ligasen erzielt. Ubiquitin-Gene werden durch zellulären Stress, wie Hitze induziert (Fornace et al., 1989). Die

Ubiquitin-Proteasen entfernen konjugierte Ubiquitin-Reste von Proteinen und führen die Ubiquitin-Monomere wieder dem Pool an freiem Ubiquitin zu, der den E3-Ligasen als Substrat dient, um andere Proteine zu ubiquitinieren. In der Hefe konnte gezeigt werden, dass die Depletion des freien Ubiquitin-Pools durch die Behandlung mit Cycloheximid die Überlebensfähigkeit der Zellen reduziert (Hanna et al., 2003). Einen ähnlichen Phänotyp erzeugt der Knockdown der Ubiquitin-Gene in MEF-Zellen. Nach Knockdown proliferieren die Zellen langsamer, treten verzögert in die Mitose ein und zeigen Anzeichen vorzeitiger Alterung (Ryu et al., 2007). Der Knockdown der Ubiquitin-Gene führt zu einer Reduktion des Pools an freiem Ubiquitin, beeinflusst aber nicht die Menge an konjugiertem Ubiquitin. Die Überexpression der Ubiquitin-Gene ist mit einer verstärkten Proliferation in Krebszellen assoziiert, während ihr Knockdown Apoptose auslöst. Das Ubiquitinierungssystem ist daher ein potentielles Ziel von neuen Krebstherapien (Oh et al., 2013).

Somit lässt sich der Proliferationsdefekt von  $\Delta WW$  vermutlich auf eine Entleerung des freien Ubiquitin-Pools zurückführen, da  $\Delta WW$  aktiviertes Ubiquitin binden, dieses aber nicht auf das Zielprotein übertragen kann.  $\Delta HECT$  kann Substratproteine binden, aber diese nicht ubiquitinieren. Somit könnte  $\Delta HECT$  mit dem WWP1 Wildtyp um Bindungsstellen in den Substratproteinen konkurrieren. Da  $\Delta HECT$  aber keinen Wachstumsdefekt zeigt, scheint die Zelle diesen Defekt kompensieren zu können.

Cisplatin ist ein in der Krebstherapie eingesetztes Zytostatikum und führt zu Interstrang-Verknüpfungen in der DNA. An diesen DNA-Schäden wird eine transkribierende RNAPII blockiert und induziert transkriptionsgekoppelte Reparaturmechanismen. Damit die DNA-Läsion für die Reparatur zugänglich ist, wird die RNAPII vom Template entfernt oder die RNAPII rutscht auf der DNA-Matrize zurück. TFIIIS hilft der RNAPII beim Zurückrutschen und beim Schneiden des Transkripts. Eine arretierte RNAPII muss von der DNA gelöst werden, damit die Transkription des Gens nicht nachhaltig blockiert wird. Dauerhaft arretierte RNAPII werden an Rpb1 ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Jung et al., 2006). Die Cisplatin-Behandlung von H1299-Lungenkarzinom-Zellen, die Wildtyp-WWP1 oder die Mutante  $\Delta HECT$  exprimieren, führt zu einem Abbau der RNAPII und einer Reduktion der Histon H2B-Ubiquitinierung. Durch die Expression von  $\Delta WW$  wird der Abbau der RNAPII gehemmt und die Ubiquitinierung von H2B bleibt stabil. Der Phänotyp der  $\Delta WW$ -Überexpression unterstützt das Modell, dass der Pool an freiem

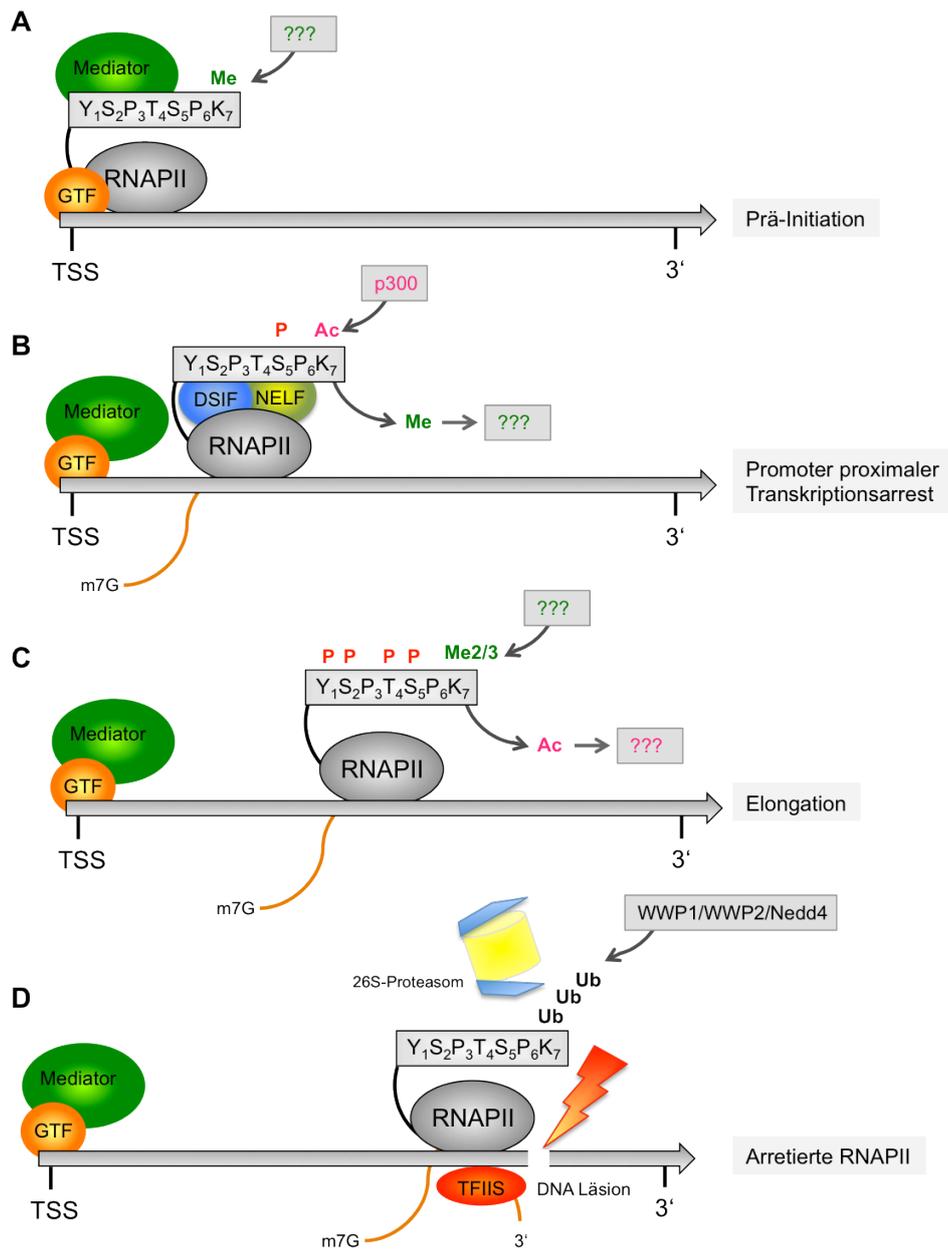
Ubiquitin geleert wird und eine an DNA-Schäden arretierte RNAPII nicht ubiquitiniert sowie abgebaut wird. Dadurch verbleibt die RNAPII auf der DNA und die H2B-Ubiquitinierung, normalerweise ein Kennzeichen aktiver Transkription, bleibt stabil.

### **4.8. Die Modifikationen des Lysin7 der CTD während der Transkription**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich verschiedene Modifikationen des Lysin7 in der CTD nachweisen. Vor allem auf Grundlage der ChIP-Daten und der massenspektrometrischen Analyse der distalen CTD ist es möglich, die verschiedenen Lysin7-Modifikationen den einzelnen Phasen des Transkriptionszyklus zuzuordnen. In meinem Modell ist die CTD bereits während der Assemblierung des Prä-Initiationskomplexes mono-methyliert, wodurch eine vorzeitige Acetylierung beziehungsweise Ubiquitinierung der CTD verhindert wird. Die verantwortliche Lysin7-Methyltransferase konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden (Abb. 30 A).

Cdk7 phosphoryliert die CTD an den Serin5-Resten, wodurch sich die RNAPII vom Promotor löst. In dieser frühen Phase der Elongation binden DISF und NELF an die RNAPII und induzieren den Promotor-proximalen Transkriptionsarrest. p300/KAT3B acetyliert die Lysine an Position sieben in der CTD in dieser Phase des Transkriptionszyklus. Voraussetzung ist, dass einige Lysine in der CTD nicht methyliert sind oder durch ein noch unbekanntes Enzym demethyliert werden. Vor allem an Wachstumsfaktor (EGF) induzierten Genen, wie c-Fos und Egr2, kann eine RNAPII mit CTD-Lysin7-Acetylierungen während des Promotor-proximalen Transkriptionsarrests nachgewiesen werden (Schröder et al. 2013) (Abb. 30 B).

In der Phase der produktiven Elongation werden die Lysin-Acetylierungen durch eine unbekannt Deacetylase entfernt und die Lysine an Position sieben in der CTD di- sowie tri-methyliert. Unklar ist, ob die Mono-, Di- und Tri-Methylierung während des Transkriptionszyklus durch eine oder verschiedene Methyltransferasen katalysiert wird (Abb. 30 C).



**Abbildung 30: Modell zu den Modifikationen des Lysin7 in der CTD während der Transkription.** Exemplarisch abgebildet ist eine RNAPII mit einem Nicht-Konsensus-Heptad und ein Gen mit Transkriptionsstartstelle (TSS) sowie 3'Ende. A) Prä-Initiation: Am Promotor assembliert sich der Prä-Initiationskomplex bestehend aus dem Mediator, der RNAPII und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTF). Lysin7 der RNAPII-CTD scheint in dieser Phase bereits mono-methyliert zu sein durch eine noch unbekannte Methyltransferase. B) Die Phosphorylierung von Serin5 in der CTD führt zum Ablösen der RNAPII vom Promotor und DSIF und NELF induzieren den Promotor-proximalen Transkriptionsarrest. Eine unbekannte Demethylase muss einige Lysine an Position sieben demethylieren damit p300/KAT3B das Lysin7 in der CTD acetylieren kann. C) Während der Elongation muss die CTD-Lysin7-Acetylierung durch ein noch unbekanntes Enzym entfernt werden. Das Lysin7 der CTD scheint während der Elongation vor allem di- und tri-methyliert zu sein. Das verantwortliche Enzym ist noch nicht beschrieben. D) DNA-Läsionen führen zum Transkriptionsarrest der RNAPII und induzieren die transkriptionsgekoppelte Reparatur. TFIIIS hilft der RNAPII auf der DNA zurück zu rutschen, damit die DNA-Läsion zugänglich ist. Arretierte Polymerasen können durch WWP1/WWP2 und Nedd4 an den Lysinresten der CTD ubiquitiniert und vom Proteasom degradiert werden.

Chemische Agenzien wie Cisplatin oder UV-, sowie radioaktive Strahlung können zu DNA-Läsionen in der DNA führen, wodurch eine elongierende RNAPII an diesen Stellen gestoppt wird. Die arretierte RNAPII induziert transkriptionsgekoppelte Reparaturmechanismen und TFIIIS hilft der RNAPII beim Schneiden des Transkripts und dem Zurückrutschen auf der DNA, damit die DNA-Läsion zugänglich ist. Eine arretierte RNAPII wird durch die E3-Ubiquitin-Ligasen WWP1, WWP2 und Nedd4 ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut, damit das DNA-Template für nachfolgende RNAPII passierbar ist. Unklar ist, ob die verschiedenen Ubiquitin-Ligasen als Reaktion auf unterschiedliche Reize differenziell induziert werden (Abb. 30 D).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Lysine an Position sieben in der CTD mono-, di-, tri-methyliert, acetyliert und ubiquitiniert werden können. Ob das Modifikationsspektrum durch die Sumoylierung, Neddylierung beziehungsweise Hydroxylierung noch erweitert werden kann, bleibt offen.

### **4.9. Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Modifikationsspektrum der RNAPII um die CTD-Lysin7-Methylierung erweitert werden, was zu neuen Fragen führt. Unklar bleibt, welche Methyltransferase die Lysin7-Methylierung der CTD katalysiert. Ein besonderes Augenmerk liegt hier auf den Histonmethyltransferasen, da diese eng mit der Transkriptionsmaschinerie verknüpft sind und viele Histonmethyltransferasen auch Nicht-Histon-Proteine als beschriebene Substrate besitzen. Ein möglicher Ansatz wären siRNA-Knockdown-Experimente. Mit dem 1F5-Antikörper steht ein geeignetes Mittel zur Verfügung, die Effekte der siRNA-Knockdowns von Histonmethyltransferasen auf die Lysin7-Methylierung zu beurteilen. Die ChIP-Profile der CTD-Lysin7-Methylierung belegen, dass diese Modifikation reversibel ist und entsprechend ist die Identifizierung der Demethylase von Interesse. Durch das Wechselspiel der CTD-Lysin7-Methylierung und -Acetylierung wird die Expression der unmittelbar frühen Gene beeinflusst, als Reaktion auf den aktivierten EGF-Signaltransduktionsweg. Neben dem EGF-Signaltransduktionsweg wurden die Interferon- und Interleukin-Signaltransduktionswege erst spät in Vertebraten entwickelt. Genklassen, die durch diese evolutionär spät entwickelten Signaltransduktionskaskaden induziert werden, könnten ebenfalls durch die CTD-Lysin7-Modifikationen reguliert werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene CTD-

Lysin-Mutanten hergestellt. Deren weiterführende Analyse mittels RNA-Seq könnte Hinweise liefern, ob weitere Genklassen durch die CTD-Lysin-7-Modifikationen in ihrer Expression beeinflusst werden. Signaltransduktionswege werden unter anderem durch extra- oder intrazelluläre Reize aktiviert. In diesem Zusammenhang wäre die Charakterisierung der Lysin7-Mutanten unter Stress interessant. CTD-Lysin7-Mutanten können unter physiologischen Zellkulturbedingungen ohne deutlich erkennbare Wachstumsnachteile proliferieren. In der Hefe wurde beschrieben, dass die Substitution der CTD-Threonin4 oder Serin7 Aminosäuren zu Alanin eine erhöhte Stresssensitivität zur Folge hat. Ob ein CTD-Lysin7-Austausch zu Serin einen ähnlichen Effekt in einem Säuger-Zellsystem hat, ist unklar.

Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass das Lysin7 der CTD durch WWP1 ubiquitiniert werden kann. WWP1 ist damit die dritte E3-Ubiquitin-Ligase, der Nedd4-Familie, die das Lysin7 in der CTD ubiquitiniert. Durch die Massenspektrometrie konnte mit ITCH sogar noch eine weitere HECT-Ligase der Nedd4-Familie identifiziert werden, die mit der RNAPII assoziiert ist. Ein nächster Schritt wäre die Validierung der Interaktion von ITCH und der RNAPII und die Frage ob die RNAPII ein Substrat für die E3-Ligase ITCH ist. Dadurch könnte der Familie der Nedd4-Ligasen eine besondere Funktion beim stressbedingten Abbau von Rpb1 zukommen. Bezugnehmend auf die Erkenntnisse von Chaudhary et al., 2014 sollte überprüft werden, ob WWP1 und WWP2 an der RNAPII Heterodimere ausbilden und ob die Aktivität der E3-Ligasen dadurch reguliert wird.

## 5. Literaturverzeichnis

### A

Adelman, K., and Lis, J.T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet* 13, 720-731.

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

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

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), 2493-2500.

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

Anindya, R., Aygun, O., and Svejstrup, J.Q. (2007). Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol Cell* 28, 386-397.

### B

Baillat, D., Hakimi, M.A., Naar, A.M., Shilatifard, A., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell* 123, 265-276.

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, 2303-2316.

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, 586-594.

Bartolomei, M.S., Halden, N.F., Cullen, C.R., and Corden, J.L. (1988). Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 8, 330-339.

Baskaran, R., Escobar, S.R., and Wang, J.Y. (1999). Nuclear c-Abl is a COOH-terminal

repeated domain (CTD)-tyrosine (CTD)-tyrosine kinase-specific for the mammalian RNA polymerase II: possible role in transcription elongation. *Cell Growth Differ* 10, 387-396.

Beaudenon, S.L., Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P., and Huibregtse, J.M. (1999). Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 6972-6979.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301, 1090-1093.

Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A., and Melino, G. (2008). The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 14, 10-21.

Binda, O. (2013). On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics* 8, 457-463.

Bintu, L., Ishibashi, T., Dangkulwanich, M., Wu, Y.Y., Lubkowska, L., Kashlev, M., and Bustamante, C. (2012). Nucleosomal elements that control the topography of the barrier to transcription. *Cell* 151, 738-749.

Bintu, L., Kopaczynska, M., Hodges, C., Lubkowska, L., Kashlev, M., and Bustamante, C. (2011). The elongation rate of RNA polymerase determines the fate of transcribed nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1394-1399.

Blazek, D., Kohoutek, J., Bartholomeeusen, K., Johansen, E., Hulinkova, P., Luo, Z., Cimermancic, P., Ule, J., and Peterlin, B.M. (2011). The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev* 25, 2158-2172.

Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.

Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.C., Ahmad, Y., Neel, H., *et al.* (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell* 39, 912-924.

Bowman, E.A., and Kelly, W.G. (2014). RNA polymerase II transcription elongation and Pol II CTD Ser2 phosphorylation: A tail of two kinases. *Nucleus* 5, 224-236.

Bres, V., Yoh, S.M., and Jones, K.A. (2008). The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol* 20, 334-340.

Brickey, W.J., and Greenleaf, A.L. (1995). Functional studies of the carboxy-terminal repeat domain of *Drosophila* RNA polymerase II in vivo. *Genetics* 140, 599-613.

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

Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36, 541-546.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.

## C

Chantry, A. (2011). WWP2 ubiquitin ligase and its isoforms: new biological insight and promising disease targets. *Cell Cycle* 10, 2437-2439.

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

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

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

Chaudhary, N., and Maddika, S. (2014). WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and DeltaNp73 levels. *Mol Cell Biol* 34, 3754-3764.

Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X.Y., Sethi, P., Zhou, W., Zhou, Z., Petros, J., Frierson, H.F., Jr., Vessella, R.L., *et al.* (2007). Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* 26, 2386-2394.

Chen, C., Zhou, Z., Ross, J.S., Zhou, W., and Dong, J.T. (2007). The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *Int J Cancer* 121, 80-87.

Cheng, Q., Cao, X., Yuan, F., Li, G., and Tong, T. (2014). Knockdown of WWP1 inhibits growth and induces apoptosis in hepatoma carcinoma cells through the activation of caspase3 and p53. *Biochem Biophys Res Commun* 448, 248-254.

Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.

Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O., and Reinberg, D. (1999). A

protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* 13, 1540-1552.

Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 30, 250-255.

Corden, J.L. (2013). RNA polymerase II C-terminal domain: Tethering transcription to transcript and template. *Chem Rev* 113, 8423-8455.

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

## D

Daulny, A., Geng, F., Muratani, M., Geisinger, J.M., Salghetti, S.E., and Tansey, W.P. (2008). Modulation of RNA polymerase II subunit composition by ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19649-19654.

Descostes, N., Heidemann, M., Spinelli, L., Schuller, R., Maqbool, M.A., Fenouil, R., Koch, F., Innocenti, C., Gut, M., Gut, I., *et al.* (2014). Tyrosine phosphorylation of RNA polymerase II CTD is associated with antisense promoter transcription and active enhancers in mammalian cells. *Elife* 3, e02105.

Devaiah, B.N., and Singer, D.S. (2012). Cross-talk among RNA polymerase II kinases modulates C-terminal domain phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 38755-38766.

Dichtl, B., Blank, D., Ohnacker, M., Friedlein, A., Roeder, D., Langen, H., and Keller, W. (2002). A role for SSU72 in balancing RNA polymerase II transcription elongation and termination. *Mol Cell* 10, 1139-1150.

Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D., and Hanawalt, P.C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8502-8506.

Dunn, R., Klos, D.A., Adler, A.S., and Hicke, L. (2004). The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J Cell Biol* 165, 135-144.

Egloff, S., Dienstbier, M., and Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends Genet* 28, 333-341.

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

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

snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.

Egloff, S., Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T., and Murphy, S. (2012). Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPAP2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Mol Cell* 45, 111-122.

## F

Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S., and Lima, C.D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 11, 1549-1561.

Fornace, A.J., Jr., Alamo, I., Jr., Hollander, M.C., and Lamoreaux, E. (1989). Ubiquitin mRNA is a major stress-induced transcript in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17, 1215-1230.

## G

Grimm, T., Holzel, M., Rohmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res* 34, 3030-3043.

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

Guglielmi, B., van Berkum, N.L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H.M., Holstege, F.C., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res* 32, 5379-5391.

## H

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

Hanna, J., Leggett, D.S., and Finley, D. (2003). Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol Cell Biol* 23, 9251-9261.

Harreman, M., Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., Kong, S.E., Banks, C.A., Conaway, R.C., Conaway, J.W., *et al.* (2009). Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20705-20710.

Heidemann, M., Hintermair, C., Voss, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim Biophys Acta* 1829, 55-62.

Heine, G.F., Horwitz, A.A., and Parvin, J.D. (2008). Multiple mechanisms contribute to inhibit transcription in response to DNA damage. *J Biol Chem* 283, 9555-9561.

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.

Hintermair, C., Heidemann, M., Koch, F., Descostes, N., Gut, M., Gut, I., Fenouil, R., Ferrier, P., Flatley, A., Kremmer, E., *et al.* (2012). Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *EMBO J* 31, 2784-2797.

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

Holzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W., *et al.* (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, 367-378.

Hsin, J.P., Sheth, A., and Manley, J.L. (2011). RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* 334, 683-686.

Hsu, P.L., Yang, F., Smith-Kinnaman, W., Yang, W., Song, J.E., Mosley, A.L., and Varani, G. (2014). Rtr1 is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates Tyr1 and Ser5 on the RNA polymerase II CTD. *J Mol Biol* 426, 2970-2981.

Huibregtse, J.M., Yang, J.C., and Beaudenon, S.L. (1997). The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3656-3661.

## **J**

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Jost, C.A., Marin, M.C., and Kaelin, W.G., Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389, 191-194.

Jung, Y., and Lippard, S.J. (2006). RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. *J Biol Chem* 281, 1361-1370.

## **K**

Kakahara, Y., and Houry, W.A. (2012). The R2TP complex: discovery and functions.

Biochim Biophys Acta 1823, 101-107.

Kamura, T., Burian, D., Yan, Q., Schmidt, S.L., Lane, W.S., Querido, E., Branton, P.E., Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2001). Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 276, 29748-29753.

Kellner, M., Rohmoser, M., Forne, I., Voss, K., Burger, K., Muhl, B., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Imhof, A., and Eick, D. (2015). DEAD-box helicase DDX27 regulates 3' end formation of ribosomal 47S RNA and stably associates with the PeBoW-complex. *Exp Cell Res* 334, 146-159.

Kim, H., Erickson, B., Luo, W., Seward, D., Graber, J.H., Pollock, D.D., Megee, P.C., and Bentley, D.L. (2010). Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1279-1286.

Kim, M., Ahn, S.H., Krogan, N.J., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *EMBO J* 23, 354-364.

Kireeva, M.L., Hancock, B., Cremona, G.H., Walter, W., Studitsky, V.M., and Kashlev, M. (2005). Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol Cell* 18, 97-108.

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

Kong, S.E., Kobor, M.S., Krogan, N.J., Somesh, B.P., Sogaard, T.M., Greenblatt, J.F., and Svejstrup, J.Q. (2005). Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator. *J Biol Chem* 280, 4299-4306.

Kornberg, R.D. (2007). The molecular basis of eucaryotic transcription. *Cell Death Differ* 14, 1989-1997.

Kouzarides, T. (2007). SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* 131, 822.

Krishnamurthy, S., Ghazy, M.A., Moore, C., and Hampsey, M. (2009). Functional interaction of the Ess1 prolyl isomerase with components of the RNA polymerase II initiation and termination machineries. *Mol Cell Biol* 29, 2925-2934.

## L

Laine, A., and Ronai, Z. (2007). Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* 26, 1477-1483.

Laitem, C., and Murphy, S. (2013). AC/D(eA)C rocks the polymerases. *Mol Cell* 52,

287-288.

Li, H., Zhang, Z., Wang, B., Zhang, J., Zhao, Y., and Jin, Y. (2007). Wwp2-mediated ubiquitination of the RNA polymerase II large subunit in mouse embryonic pluripotent stem cells. *Mol Cell Biol* 27, 5296-5305.

Licatalosi, D.D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J.B., and Bentley, D.L. (2002). Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II. *Mol Cell* 9, 1101-1111.

Liu, P., Kenney, J.M., Stiller, J.W., and Greenleaf, A.L. (2010). Genetic organization, length conservation, and evolution of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Mol Biol Evol* 27, 2628-2641.

Lubitz, S., Glaser, S., Schaft, J., Stewart, A.F., and Anastassiadis, K. (2007). Increased apoptosis and skewed differentiation in mouse embryonic stem cells lacking the histone methyltransferase Mll2. *Mol Biol Cell* 18, 2356-2366.

## M

Ma, H., Baumann, C.T., Li, H., Strahl, B.D., Rice, R., Jelinek, M.A., Aswad, D.W., Allis, C.D., Hager, G.L., and Stallcup, M.R. (2001). Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol* 11, 1981-1985.

MacKellar, A.L., and Greenleaf, A.L. (2011). Cotranscriptional association of mRNA export factor Yra1 with C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 286, 36385-36395.

Malik, S., Gu, W., Wu, W., Qin, J., and Roeder, R.G. (2000). The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol Cell* 5, 753-760.

Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J.L., Simons, C.T., Lewis, S.A., Bartolini, F., Cowan, N.J., and Valpuesta, J.M. (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J* 21, 6377-6386.

Mayer, A., Heidemann, M., Lidschreiber, M., Schrieck, A., Sun, M., Hintermair, C., Kremmer, E., Eick, D., and Cramer, P. (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science* 336, 1723-1725.

Mayer, A., Lidschreiber, M., Siebert, M., Leike, K., Soding, J., and Cramer, P. (2010). Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1272-1278.

McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J.,

Patterson, S.D., Wickens, M., and Bentley, D.L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.

Medlin, J.E., Uguen, P., Taylor, A., Bentley, D.L., and Murphy, S. (2003). The C-terminal domain of pol II and a DRB-sensitive kinase are required for 3' processing of U2 snRNA. *EMBO J* 22, 925-934.

Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* 430, 223-226.

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

Millan-Zambrano, G., and Chavez, S. (2014). Nuclear functions of prefoldin. *Open Biol* 4.

Millan-Zambrano, G., Rodriguez-Gil, A., Penate, X., de Miguel-Jimenez, L., Morillo-Huesca, M., Krogan, N., and Chavez, S. (2013). The prefoldin complex regulates chromatin dynamics during transcription elongation. *PLoS Genet* 9, e1003776.

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, 168-178.

Moteki, S., and Price, D. (2002). Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Mol Cell* 10, 599-609.

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

Naar, A.M., Taatjes, D.J., Zhai, W., Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev* 16, 1339-1344.

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.

Ni, Z., Schwartz, B.E., Werner, J., Suarez, J.R., and Lis, J.T. (2004). Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* 13, 55-65.

Noble, C.G., Hollingworth, D., Martin, S.R., Ennis-Adeniran, V., Smerdon, S.J., Kelly, G., Taylor, I.A., and Ramos, A. (2005). Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD. *Nat Struct Mol Biol* 12, 144-151.

Nonet, M.L., and Young, R.A. (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* 123, 715-724.

## O

Oh, C., Park, S., Lee, E.K., and Yoo, Y.J. (2013). Downregulation of ubiquitin level via knockdown of polyubiquitin gene Ubb as potential cancer therapeutic intervention. *Sci Rep* 3, 2623.

## P

Park, C.W., and Ryu, K.Y. (2014). Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis. *BMB Rep* 47, 475-482.

Pascual-Garcia, P., Govind, C.K., Queralt, E., Cuenca-Bono, B., Llopis, A., Chavez, S., Hinnebusch, A.G., and Rodriguez-Navarro, S. (2008). Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev* 22, 2811-2822.

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, 703-717.

Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.

Prenzel, T., Begus-Nahrmann, Y., Kramer, F., Hennion, M., Hsu, C., Gorsler, T., Hintermair, C., Eick, D., Kremmer, E., Simons, M., *et al.* (2011). Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res* 71, 5739-5753.

## Q

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

## R

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, 5184-5189.

Rini, J.M., Schulze-Gahmen, U., and Wilson, I.A. (1992). Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 255, 959-965.

Rohrmoser, 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, 3682-3694.

Rosonina, E., Kaneko, S., and Manley, J.L. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev* 20, 1050-1056.

Ryu, K.Y., Maehr, R., Gilchrist, C.A., Long, M.A., Bouley, D.M., Mueller, B., Ploegh, H.L., and Kopito, R.R. (2007). The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *EMBO J* 26, 2693-2706.

## S

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

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T.J., Florens, L., Zybaylov, B., Swanson, S.K., Banks, C.A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M.P., *et al.* (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* 14, 685-691.

Schneider, M.R., and Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 218, 460-466.

Schrieck, A., Easter, A.D., Etzold, S., Wiederhold, K., Lidschreiber, M., Cramer, P., and Passmore, L.A. (2014). RNA polymerase II termination involves C-terminal-domain tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nat Struct Mol Biol* 21, 175-179.

Schroeder, S., Herker, E., Itzen, F., He, D., Thomas, S., Gilchrist, D.A., Kaehlcke, K., Cho, S., Pollard, K.S., Capra, J.A., *et al.* (2013). Acetylation of RNA polymerase II regulates growth-factor-induced gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell* 52, 314-324.

Schwer, B., and Shuman, S. (2011). Deciphering the RNA polymerase II CTD code in fission yeast. *Mol Cell* 43, 311-318.

Shi, Y., Chan, S., and Martinez-Santibanez, G. (2009). An up-close look at the pre-mRNA 3'-end processing complex. *RNA Biol* 6, 522-525.

Shilatifard, A. (2008). Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 341-348.

Simons, C.T., Staes, A., Rommelaere, H., Ampe, C., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (2004). Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding. *J Biol Chem* 279, 4196-4203.

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.

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

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

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

Svejstrup, J.Q. (2002). Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 21-29.

## T

Taatjes, D.J., Naar, A.M., Andel, F., 3rd, Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295, 1058-1062.

## V

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

Verdecia, M.A., Joazeiro, C.A., Wells, N.J., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Hunter, T., and Noel, J.P. (2003). Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell* 11, 249-259.

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

## W

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

Wang, G., Cantin, G.T., Stevens, J.L., and Berk, A.J. (2001). Characterization of mediator complexes from HeLa cell nuclear extract. *Mol Cell Biol* 21, 4604-4613.

Wang, J., Peng, Q., Lin, Q., Childress, C., Carey, D., and Yang, W. (2010). Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J Biol Chem* 285, 12279-12288.

Wang, W., Ye, W., Yu, Q., Jiang, C., Zhang, J., Luo, R., and Chen, H.F. (2013). Conformational selection and induced fit in specific antibody and antigen recognition: SPE7 as a case study. *J Phys Chem B* 117, 4912-4923.

Wegierski, T., Hill, K., Schaefer, M., and Walz, G. (2006). The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. *EMBO J* 25, 5659-5669.

Werner, M., Thuriaux, P., and Soutourina, J. (2009). Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Curr Opin Struct Biol* 19, 740-745.

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, 5717-5726.

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

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

Wiesner, S., Ogunjimi, A.A., Wang, H.R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J.L., and Forman-Kay, J.D. (2007). Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* 130, 651-662.

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

## 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, 729-733.

## Y

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

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

Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505-508.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225-229.

## Z

Zee, B.M., and Garcia, B.A. (2012). Discovery of lysine post-translational modifications through mass spectrometric detection. *Essays Biochem* 52, 147-163.

Zhang, D.W., Mosley, A.L., Ramisetty, S.R., Rodriguez-Molina, J.B., Washburn, M.P., and Ansari, A.Z. (2012). Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *J Biol Chem* 287, 8541-8551.

Zhang, D.W., Rodriguez-Molina, J.B., Tietjen, J.R., Nemecek, C.M., and Ansari, A.Z. (2012). Emerging Views on the CTD Code. *Genet Res Int* 2012, 347214.

Zhang, M., Wang, X.J., Chen, X., Bowman, M.E., Luo, Y., Noel, J.P., Ellington, A.D., Etzkorn, F.A., and Zhang, Y. (2012). Structural and kinetic analysis of polyisomerization/phosphorylation cross-talk in the CTD code. *ACS Chem Biol* 7, 1462-1470.

Zhi, X., and Chen, C. (2012). WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell Mol Life Sci* 69, 1425-1434.

Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., and Chen, X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 58, 5061-5065.

Zhu, X., Wiren, M., Sinha, I., Rasmussen, N.N., Linder, T., Holmberg, S., Ekwall, K., and Gustafsson, C.M. (2006). Genome-wide occupancy profile of mediator and the Srb8-11 module reveals interactions with coding regions. *Mol Cell* 22, 169-178.

## 5. Literaturverzeichnis

### A

Adelman, K., and Lis, J.T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet* 13, 720-731.

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

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

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), 2493-2500.

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

Anindya, R., Aygun, O., and Svejstrup, J.Q. (2007). Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol Cell* 28, 386-397.

### B

Baillat, D., Hakimi, M.A., Naar, A.M., Shilatifard, A., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell* 123, 265-276.

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, 2303-2316.

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, 586-594.

Bartolomei, M.S., Halden, N.F., Cullen, C.R., and Corden, J.L. (1988). Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 8, 330-339.

Baskaran, R., Escobar, S.R., and Wang, J.Y. (1999). Nuclear c-Abl is a COOH-terminal

repeated domain (CTD)-tyrosine (CTD)-tyrosine kinase-specific for the mammalian RNA polymerase II: possible role in transcription elongation. *Cell Growth Differ* 10, 387-396.

Beaudenon, S.L., Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P., and Huibregtse, J.M. (1999). Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 6972-6979.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301, 1090-1093.

Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A., and Melino, G. (2008). The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 14, 10-21.

Binda, O. (2013). On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics* 8, 457-463.

Bintu, L., Ishibashi, T., Dangkulwanich, M., Wu, Y.Y., Lubkowska, L., Kashlev, M., and Bustamante, C. (2012). Nucleosomal elements that control the topography of the barrier to transcription. *Cell* 151, 738-749.

Bintu, L., Kopaczynska, M., Hodges, C., Lubkowska, L., Kashlev, M., and Bustamante, C. (2011). The elongation rate of RNA polymerase determines the fate of transcribed nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1394-1399.

Blazek, D., Kohoutek, J., Bartholomeeusen, K., Johansen, E., Hulinkova, P., Luo, Z., Cimermancic, P., Ule, J., and Peterlin, B.M. (2011). The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev* 25, 2158-2172.

Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.

Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.C., Ahmad, Y., Neel, H., *et al.* (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell* 39, 912-924.

Bowman, E.A., and Kelly, W.G. (2014). RNA polymerase II transcription elongation and Pol II CTD Ser2 phosphorylation: A tail of two kinases. *Nucleus* 5, 224-236.

Bres, V., Yoh, S.M., and Jones, K.A. (2008). The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol* 20, 334-340.

Brickey, W.J., and Greenleaf, A.L. (1995). Functional studies of the carboxy-terminal repeat domain of *Drosophila* RNA polymerase II in vivo. *Genetics* 140, 599-613.

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

Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36, 541-546.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.

## C

Chantry, A. (2011). WWP2 ubiquitin ligase and its isoforms: new biological insight and promising disease targets. *Cell Cycle* 10, 2437-2439.

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

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

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

Chaudhary, N., and Maddika, S. (2014). WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and DeltaNp73 levels. *Mol Cell Biol* 34, 3754-3764.

Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X.Y., Sethi, P., Zhou, W., Zhou, Z., Petros, J., Frierson, H.F., Jr., Vessella, R.L., *et al.* (2007). Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* 26, 2386-2394.

Chen, C., Zhou, Z., Ross, J.S., Zhou, W., and Dong, J.T. (2007). The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *Int J Cancer* 121, 80-87.

Cheng, Q., Cao, X., Yuan, F., Li, G., and Tong, T. (2014). Knockdown of WWP1 inhibits growth and induces apoptosis in hepatoma carcinoma cells through the activation of caspase3 and p53. *Biochem Biophys Res Commun* 448, 248-254.

Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.

Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O., and Reinberg, D. (1999). A

protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* 13, 1540-1552.

Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 30, 250-255.

Corden, J.L. (2013). RNA polymerase II C-terminal domain: Tethering transcription to transcript and template. *Chem Rev* 113, 8423-8455.

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

## D

Daulny, A., Geng, F., Muratani, M., Geisinger, J.M., Salghetti, S.E., and Tansey, W.P. (2008). Modulation of RNA polymerase II subunit composition by ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19649-19654.

Descostes, N., Heidemann, M., Spinelli, L., Schuller, R., Maqbool, M.A., Fenouil, R., Koch, F., Innocenti, C., Gut, M., Gut, I., *et al.* (2014). Tyrosine phosphorylation of RNA polymerase II CTD is associated with antisense promoter transcription and active enhancers in mammalian cells. *Elife* 3, e02105.

Devaiah, B.N., and Singer, D.S. (2012). Cross-talk among RNA polymerase II kinases modulates C-terminal domain phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 38755-38766.

Dichtl, B., Blank, D., Ohnacker, M., Friedlein, A., Roeder, D., Langen, H., and Keller, W. (2002). A role for SSU72 in balancing RNA polymerase II transcription elongation and termination. *Mol Cell* 10, 1139-1150.

Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D., and Hanawalt, P.C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8502-8506.

Dunn, R., Klos, D.A., Adler, A.S., and Hicke, L. (2004). The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J Cell Biol* 165, 135-144.

Egloff, S., Dienstbier, M., and Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends Genet* 28, 333-341.

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

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

snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.

Egloff, S., Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T., and Murphy, S. (2012). Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPAP2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Mol Cell* 45, 111-122.

## F

Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S., and Lima, C.D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 11, 1549-1561.

Fornace, A.J., Jr., Alamo, I., Jr., Hollander, M.C., and Lamoreaux, E. (1989). Ubiquitin mRNA is a major stress-induced transcript in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17, 1215-1230.

## G

Grimm, T., Holzel, M., Rohmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res* 34, 3030-3043.

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

Guglielmi, B., van Berkum, N.L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H.M., Holstege, F.C., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res* 32, 5379-5391.

## H

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

Hanna, J., Leggett, D.S., and Finley, D. (2003). Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol Cell Biol* 23, 9251-9261.

Harreman, M., Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., Kong, S.E., Banks, C.A., Conaway, R.C., Conaway, J.W., *et al.* (2009). Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20705-20710.

Heidemann, M., Hintermair, C., Voss, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim Biophys Acta* 1829, 55-62.

Heine, G.F., Horwitz, A.A., and Parvin, J.D. (2008). Multiple mechanisms contribute to inhibit transcription in response to DNA damage. *J Biol Chem* 283, 9555-9561.

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.

Hintermair, C., Heidemann, M., Koch, F., Descostes, N., Gut, M., Gut, I., Fenouil, R., Ferrier, P., Flatley, A., Kremmer, E., *et al.* (2012). Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *EMBO J* 31, 2784-2797.

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

Holzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W., *et al.* (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, 367-378.

Hsin, J.P., Sheth, A., and Manley, J.L. (2011). RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* 334, 683-686.

Hsu, P.L., Yang, F., Smith-Kinnaman, W., Yang, W., Song, J.E., Mosley, A.L., and Varani, G. (2014). Rtr1 is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates Tyr1 and Ser5 on the RNA polymerase II CTD. *J Mol Biol* 426, 2970-2981.

Huibregtse, J.M., Yang, J.C., and Beaudenon, S.L. (1997). The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3656-3661.

## **J**

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Jost, C.A., Marin, M.C., and Kaelin, W.G., Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389, 191-194.

Jung, Y., and Lippard, S.J. (2006). RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. *J Biol Chem* 281, 1361-1370.

## **K**

Kakihara, Y., and Houry, W.A. (2012). The R2TP complex: discovery and functions.

Biochim Biophys Acta 1823, 101-107.

Kamura, T., Burian, D., Yan, Q., Schmidt, S.L., Lane, W.S., Querido, E., Branton, P.E., Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2001). Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 276, 29748-29753.

Kellner, M., Rohmoser, M., Forne, I., Voss, K., Burger, K., Muhl, B., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Imhof, A., and Eick, D. (2015). DEAD-box helicase DDX27 regulates 3' end formation of ribosomal 47S RNA and stably associates with the PeBoW-complex. *Exp Cell Res* 334, 146-159.

Kim, H., Erickson, B., Luo, W., Seward, D., Graber, J.H., Pollock, D.D., Megee, P.C., and Bentley, D.L. (2010). Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1279-1286.

Kim, M., Ahn, S.H., Krogan, N.J., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *EMBO J* 23, 354-364.

Kireeva, M.L., Hancock, B., Cremona, G.H., Walter, W., Studitsky, V.M., and Kashlev, M. (2005). Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol Cell* 18, 97-108.

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

Kong, S.E., Kobor, M.S., Krogan, N.J., Somesh, B.P., Sogaard, T.M., Greenblatt, J.F., and Svejstrup, J.Q. (2005). Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator. *J Biol Chem* 280, 4299-4306.

Kornberg, R.D. (2007). The molecular basis of eucaryotic transcription. *Cell Death Differ* 14, 1989-1997.

Kouzarides, T. (2007). SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* 131, 822.

Krishnamurthy, S., Ghazy, M.A., Moore, C., and Hampsey, M. (2009). Functional interaction of the Ess1 prolyl isomerase with components of the RNA polymerase II initiation and termination machineries. *Mol Cell Biol* 29, 2925-2934.

## L

Laine, A., and Ronai, Z. (2007). Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* 26, 1477-1483.

Laitem, C., and Murphy, S. (2013). AC/D(eA)C rocks the polymerases. *Mol Cell* 52,

287-288.

Li, H., Zhang, Z., Wang, B., Zhang, J., Zhao, Y., and Jin, Y. (2007). Wwp2-mediated ubiquitination of the RNA polymerase II large subunit in mouse embryonic pluripotent stem cells. *Mol Cell Biol* 27, 5296-5305.

Licatalosi, D.D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J.B., and Bentley, D.L. (2002). Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II. *Mol Cell* 9, 1101-1111.

Liu, P., Kenney, J.M., Stiller, J.W., and Greenleaf, A.L. (2010). Genetic organization, length conservation, and evolution of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Mol Biol Evol* 27, 2628-2641.

Lubitz, S., Glaser, S., Schaft, J., Stewart, A.F., and Anastassiadis, K. (2007). Increased apoptosis and skewed differentiation in mouse embryonic stem cells lacking the histone methyltransferase Mll2. *Mol Biol Cell* 18, 2356-2366.

## M

Ma, H., Baumann, C.T., Li, H., Strahl, B.D., Rice, R., Jelinek, M.A., Aswad, D.W., Allis, C.D., Hager, G.L., and Stallcup, M.R. (2001). Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol* 11, 1981-1985.

MacKellar, A.L., and Greenleaf, A.L. (2011). Cotranscriptional association of mRNA export factor Yra1 with C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 286, 36385-36395.

Malik, S., Gu, W., Wu, W., Qin, J., and Roeder, R.G. (2000). The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol Cell* 5, 753-760.

Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J.L., Simons, C.T., Lewis, S.A., Bartolini, F., Cowan, N.J., and Valpuesta, J.M. (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J* 21, 6377-6386.

Mayer, A., Heidemann, M., Lidschreiber, M., Schrieck, A., Sun, M., Hintermair, C., Kremmer, E., Eick, D., and Cramer, P. (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science* 336, 1723-1725.

Mayer, A., Lidschreiber, M., Siebert, M., Leike, K., Soding, J., and Cramer, P. (2010). Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1272-1278.

McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J.,

Patterson, S.D., Wickens, M., and Bentley, D.L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.

Medlin, J.E., Uguen, P., Taylor, A., Bentley, D.L., and Murphy, S. (2003). The C-terminal domain of pol II and a DRB-sensitive kinase are required for 3' processing of U2 snRNA. *EMBO J* 22, 925-934.

Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* 430, 223-226.

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

Millan-Zambrano, G., and Chavez, S. (2014). Nuclear functions of prefoldin. *Open Biol* 4.

Millan-Zambrano, G., Rodriguez-Gil, A., Penate, X., de Miguel-Jimenez, L., Morillo-Huesca, M., Krogan, N., and Chavez, S. (2013). The prefoldin complex regulates chromatin dynamics during transcription elongation. *PLoS Genet* 9, e1003776.

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, 168-178.

Moteki, S., and Price, D. (2002). Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Mol Cell* 10, 599-609.

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**

Naar, A.M., Taatjes, D.J., Zhai, W., Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev* 16, 1339-1344.

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.

Ni, Z., Schwartz, B.E., Werner, J., Suarez, J.R., and Lis, J.T. (2004). Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* 13, 55-65.

Noble, C.G., Hollingworth, D., Martin, S.R., Ennis-Adeniran, V., Smerdon, S.J., Kelly, G., Taylor, I.A., and Ramos, A. (2005). Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD. *Nat Struct Mol Biol* 12, 144-151.

Nonet, M.L., and Young, R.A. (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* 123, 715-724.

## O

Oh, C., Park, S., Lee, E.K., and Yoo, Y.J. (2013). Downregulation of ubiquitin level via knockdown of polyubiquitin gene Ubb as potential cancer therapeutic intervention. *Sci Rep* 3, 2623.

## P

Park, C.W., and Ryu, K.Y. (2014). Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis. *BMB Rep* 47, 475-482.

Pascual-Garcia, P., Govind, C.K., Queralt, E., Cuenca-Bono, B., Llopis, A., Chavez, S., Hinnebusch, A.G., and Rodriguez-Navarro, S. (2008). Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev* 22, 2811-2822.

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, 703-717.

Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.

Prenzel, T., Begus-Nahrmann, Y., Kramer, F., Hennion, M., Hsu, C., Gorsler, T., Hintermair, C., Eick, D., Kremmer, E., Simons, M., *et al.* (2011). Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res* 71, 5739-5753.

## Q

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

## R

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, 5184-5189.

Rini, J.M., Schulze-Gahmen, U., and Wilson, I.A. (1992). Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 255, 959-965.

Rohrmoser, 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, 3682-3694.

Rosonina, E., Kaneko, S., and Manley, J.L. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev* 20, 1050-1056.

Ryu, K.Y., Maehr, R., Gilchrist, C.A., Long, M.A., Bouley, D.M., Mueller, B., Ploegh, H.L., and Kopito, R.R. (2007). The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *EMBO J* 26, 2693-2706.

## S

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

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T.J., Florens, L., Zybaylov, B., Swanson, S.K., Banks, C.A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M.P., *et al.* (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* 14, 685-691.

Schneider, M.R., and Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 218, 460-466.

Schrieck, A., Easter, A.D., Etzold, S., Wiederhold, K., Lidschreiber, M., Cramer, P., and Passmore, L.A. (2014). RNA polymerase II termination involves C-terminal-domain tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nat Struct Mol Biol* 21, 175-179.

Schroeder, S., Herker, E., Itzen, F., He, D., Thomas, S., Gilchrist, D.A., Kaehlcke, K., Cho, S., Pollard, K.S., Capra, J.A., *et al.* (2013). Acetylation of RNA polymerase II regulates growth-factor-induced gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell* 52, 314-324.

Schwer, B., and Shuman, S. (2011). Deciphering the RNA polymerase II CTD code in fission yeast. *Mol Cell* 43, 311-318.

Shi, Y., Chan, S., and Martinez-Santibanez, G. (2009). An up-close look at the pre-mRNA 3'-end processing complex. *RNA Biol* 6, 522-525.

Shilatifard, A. (2008). Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 341-348.

Simons, C.T., Staes, A., Rommelaere, H., Ampe, C., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (2004). Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding. *J Biol Chem* 279, 4196-4203.

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.

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

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

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

Svejstrup, J.Q. (2002). Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 21-29.

## T

Taatjes, D.J., Naar, A.M., Andel, F., 3rd, Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295, 1058-1062.

## V

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

Verdecia, M.A., Joazeiro, C.A., Wells, N.J., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Hunter, T., and Noel, J.P. (2003). Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell* 11, 249-259.

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

## W

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

Wang, G., Cantin, G.T., Stevens, J.L., and Berk, A.J. (2001). Characterization of mediator complexes from HeLa cell nuclear extract. *Mol Cell Biol* 21, 4604-4613.

Wang, J., Peng, Q., Lin, Q., Childress, C., Carey, D., and Yang, W. (2010). Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J Biol Chem* 285, 12279-12288.

Wang, W., Ye, W., Yu, Q., Jiang, C., Zhang, J., Luo, R., and Chen, H.F. (2013). Conformational selection and induced fit in specific antibody and antigen recognition: SPE7 as a case study. *J Phys Chem B* 117, 4912-4923.

Wegierski, T., Hill, K., Schaefer, M., and Walz, G. (2006). The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. *EMBO J* 25, 5659-5669.

Werner, M., Thuriaux, P., and Soutourina, J. (2009). Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Curr Opin Struct Biol* 19, 740-745.

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, 5717-5726.

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

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

Wiesner, S., Ogunjimi, A.A., Wang, H.R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J.L., and Forman-Kay, J.D. (2007). Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* 130, 651-662.

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

## 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, 729-733.

## Y

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

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

Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505-508.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225-229.

## Z

Zee, B.M., and Garcia, B.A. (2012). Discovery of lysine post-translational modifications through mass spectrometric detection. *Essays Biochem* 52, 147-163.

Zhang, D.W., Mosley, A.L., Ramisetty, S.R., Rodriguez-Molina, J.B., Washburn, M.P., and Ansari, A.Z. (2012). Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *J Biol Chem* 287, 8541-8551.

Zhang, D.W., Rodriguez-Molina, J.B., Tietjen, J.R., Nemeč, C.M., and Ansari, A.Z. (2012). Emerging Views on the CTD Code. *Genet Res Int* 2012, 347214.

Zhang, M., Wang, X.J., Chen, X., Bowman, M.E., Luo, Y., Noel, J.P., Ellington, A.D., Etzkorn, F.A., and Zhang, Y. (2012). Structural and kinetic analysis of polyisomerization/phosphorylation cross-talk in the CTD code. *ACS Chem Biol* 7, 1462-1470.

Zhi, X., and Chen, C. (2012). WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell Mol Life Sci* 69, 1425-1434.

Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., and Chen, X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 58, 5061-5065.

Zhu, X., Wiren, M., Sinha, I., Rasmussen, N.N., Linder, T., Holmberg, S., Ekwall, K., and Gustafsson, C.M. (2006). Genome-wide occupancy profile of mediator and the Srb8-11 module reveals interactions with coding regions. *Mol Cell* 22, 169-178.

## 6. Anhang

**Tabelle A1: RNAPII interagierende Proteine.** Aufgelistet sind die 500 Proteine mit dem größten log2 Unterschied zwischen der RNAPII und den Kontrollen (Bop1, Pes1). Die Gesamtliste ist der beigefügten CD-Rom zu entnehmen.

Volcano Blot Nummer	Gen-Symbol	pval log2 fold change RNAPII vs. (Bop-Pes)	log2 fold change Pol vs (Bop-Pes)
1	POLR2B	17,80	3,52737E-06
2	POLR2C	17,63	3,64746E-05
3	RPAP2	17,59	1,64371E-10
4	GPN1	17,52	3,76035E-09
5	GPN3	16,98	1,04314E-09
6	RPRD1B	16,68	1,94696E-11
7	POLR2G	16,58	1,1633E-08
8	POLR2I	16,20	4,96728E-09
9	GRINL1	16,06	3,18552E-09
10	POLR2K	16,00	3,18485E-10
11	INTS3	15,79	6,3216E-10
12	POLR2D	15,63	5,69271E-09
13	RPAP3	15,40	9,08756E-09
14	POLR2J1	15,28	7,03131E-13
15	POLR2E	15,01	0,000712983
16	POLR2L	15,10	8,84604E-09
17	BAG2 B	14,73	0,001072865
18	C19orf	14,92	6,57288E-08
19	PIH1D1	14,89	6,24244E-09
20	ITCH I	14,80	2,87733E-08
21	RECQL5	14,67	1,52185E-09
22	UXT ub	14,47	4,57743E-08
23	INTS6	14,35	1,47578E-09
24	PDRG1	14,24	1,25879E-09
25	PPP3R1	14,25	1,94103E-07
26	PFDN2	13,96	6,95653E-10
27	RPRD1A	13,75	1,52433E-08
28	AHCYL1	13,67	4,4501E-07
29	MED27	13,34	5,29715E-10
30	C9orf8	13,28	2,37525E-10
31	GYS1 G	13,21	2,72E-08
32	MED20	13,17	1,97609E-09
33	MED17	13,09	4,12485E-08
34	WWP2 N	12,99	4,27338E-08

## Anhang

35	PTGES3	12,84	0,000293211
36	PFDN6	12,93	3,54098E-09
37	INTS12	12,89	6,28852E-08
38	MED26	12,79	2,36861E-07
39	OBFC2B	12,77	3,74653E-10
40	WWP1 I	12,75	6,87184E-07
41	INTS5	12,71	1,29165E-08
42	POLR2F	12,59	1,20162E-06
43	MED6 M	12,61	1,12436E-06
44	C11orf	12,56	4,01689E-08
45	MED14	12,48	3,7151E-08
46	INTS1	12,49	9,23055E-09
47	MED31	12,49	2,37728E-09
48	MED4 M	12,36	3,92536E-09
49	RECQL5	12,32	2,3532E-12
50	MLF2 M	12,21	1,09668E-07
51	RNGTT	12,16	2,57209E-06
52	ASB6 A	12,16	4,03715E-06
53	DNAJA2	11,99	0,003275291
54	MED8 I	12,02	3,0315E-10
55	SQSTM1	12,02	3,73779E-07
56	TCEA1	11,73	0,002992518
57	INTS8	11,97	1,70152E-08
58	CD19 B	11,98	1,23057E-05
59	MED10	11,89	4,48152E-08
60	RP11-6	11,77	0,001886015
61	POLR2H	11,25	0,005139658
62	MED19	11,66	3,4919E-08
63	PSMA6	11,63	9,23206E-07
64	TUBB4	11,42	0,002733023
65	TUBAL3	11,50	8,73945E-08
66	MED7 M	11,50	2,64631E-07
67	MED30	11,46	3,09786E-06
68	DPCD P	11,42	5,07885E-06
69	POLR2A	11,05	2,85198E-05
70	SFRS15	11,35	3,20241E-06
71	INTS9	11,33	8,14302E-10
72	DNAJC7	11,29	7,2061E-08
73	DNAJB4	11,22	1,06556E-07
74	PSMB1	11,23	2,33455E-06
75	MED22	11,18	2,16109E-08
76	PSMB3	11,20	1,96265E-08
77	MED1 I	11,12	9,72821E-07
78	PSMD3	11,09	1,99264E-07
79	MED21	11,07	1,32117E-11

## Anhang

80	ANP32B	11,05	2,00369E-05
81	CPSF3L	10,99	1,14578E-07
82	INTS2	10,95	3,93355E-07
83	PSMA7	10,81	0,00128467
84	POLR1C	10,90	2,47218E-06
85	MC1R	10,85	4,85239E-09
86	CYC1 C	10,69	0,003013069
87	BAG5 I	10,77	4,07815E-08
88	PSMB4	10,74	6,9735E-07
89	RPRD2	10,66	7,59356E-07
90	PSMD4	10,68	4,49691E-09
91	PSMA4	10,73	9,05587E-05
92	PSMB2	10,72	6,54565E-05
93	SLC25A	10,65	2,80486E-05
94	COPS2	10,60	1,4724E-05
95	IQSEC1	10,49	1,85563E-09
96	PSMC1	10,52	3,39321E-07
97	PSMD6	10,55	8,80852E-05
98	PSMA5	10,40	6,66048E-09
99	C1orf5	10,37	8,54597E-09
100	DNAJA1	9,94	0,012184174
101	DNAJB6	10,10	0,002550115
102	MTCH2	10,23	2,56118E-09
103	PSMD12	10,26	1,45025E-06
104	INTS4	10,14	2,12871E-05
105	SLC25A	10,12	0,001039784
106	SUPT6H	10,11	1,13094E-06
107	PSMA3	10,09	4,54224E-06
108	Na	9,40	0,018792568
109	PSMD1	10,04	1,05951E-11
110	PSMA2	9,90	0,002799145
111	PSMD11	10,00	0,00084454
112	RBX1 R	10,01	1,83322E-08
113	TUBA1C	9,76	0,004581842
114	GLUD1	9,98	0,000330631
115	CTPS C	9,86	0,000404195
116	STUB1	9,88	6,40678E-07
117	PNKD I	9,90	4,54425E-06
118	CHI3L2	9,74	0,001023715
119	NDUFA4	9,83	6,19486E-08
120	SRM Sp	9,78	0,001309262
121	SLC25A	10,14	0,002825108
122	CDIPT	9,80	3,73744E-06
123	PSMC4	9,63	0,000966876
124	CDKN2A	10,07	0,000129376

## Anhang

125	NDUFA1	9,73	3,65761E-08
126	RUVBL1	9,27	0,009920583
127	GNB1 G	9,60	0,006775116
128	INTS7	9,61	6,54199E-05
129	MED16	9,68	5,09232E-10
130	PSMC3	9,58	0,003686708
131	PSMC2	9,57	0,003046354
132	GRB2	9,67	6,3624E-07
133	NDUFB4	9,59	0,001057605
134	PSMD7	9,56	0,000308595
135	PSMD8	9,61	1,96249E-05
136	PNKD I	9,59	1,29903E-06
137	MED11	9,54	2,42562E-10
138	RPS27	9,35	0,024914979
139	FAM98A	9,48	2,31608E-09
140	MED15	9,42	4,43578E-06
141	PSMC6	9,41	0,001904789
142	SAPS1	9,33	1,31683E-06
143	POLR1A	9,33	0,00097932
144	PPP6C	9,32	4,3196E-05
145	Na	9,42	0,007227655
146	MCM7 I	8,93	0,008633914
147	PSMD14	9,18	5,60167E-12
148	AIFM1	9,09	0,003045491
149	RUVBL2	9,07	0,010498246
150	ACTR2	8,99	0,004862492
151	RBBP4	8,95	0,004485857
152	TRAF1	9,08	3,7406E-06
153	DNAJA3	8,86	0,003336765
154	C1orf3	9,07	1,30166E-05
155	G6PD I	8,93	0,00559673
156	RPS6KA	9,05	2,02021E-05
157	QPCTL	8,89	0,002003834
158	GPN2 G	8,96	3,81928E-10
159	PSMD2	9,20	0,001028112
160	TMED10	8,95	1,83571E-05
161	LOC652	8,17	0,019953718
162	POLR2J	8,84	1,87148E-09
163	TUBA1A	8,44	0,027688299
164	IFI30	8,60	0,019223799
165	PSMA1	8,75	0,001241782
166	BDH1 D	8,76	0,000122215
167	Na	8,64	0,00286981
168	NISCH	8,68	3,64637E-08
169	PPIL1	8,67	1,55865E-08

## Anhang

170	SAMHD1	8,60	0,002805706
171	AGK Is	8,49	0,020272654
172	SUCLA2	8,61	0,003347665
173	C18orf	8,62	2,29136E-05
174	DNAJB1	8,37	0,018532618
175	CTDP1	8,52	7,63665E-06
176	PSMD13	8,78	0,002069326
177	RCN2 3	8,32	0,018491808
178	PCNA P	8,31	0,010616279
179	TMEM33	8,22	0,018627313
180	UQCRFS	8,42	1,08385E-07
181	MCCC2	8,43	0,000169618
182	ATXN10	8,39	1,82683E-06
183	RPS27L	8,06	0,041163261
184	YJEFN3	8,34	0,005708519
185	ASMTL	8,27	0,003594662
186	DNAJB1	8,36	1,68716E-06
187	TUBB6	8,14	0,018503849
188	Na	8,20	0,01181199
189	CDC37	8,46	0,014112889
190	MTO1 m	8,30	1,10983E-06
191	SFXN4	8,31	2,2987E-05
192	IDI1 I	8,16	0,010656425
193	ATAD3B	8,25	6,88816E-05
194	CARM1	8,45	0,002709653
195	FERMT3	8,14	1,27425E-06
196	WDR61	8,10	0,001580966
197	DDX39	8,00	0,014060146
198	MAPK1	7,98	0,006993303
199	IDH3G	7,89	0,019172259
200	WDR77	7,84	0,006100004
201	PRMT5	7,83	0,018460413
202	CAD CA	8,05	0,0024519
203	NUP93	7,92	0,000491466
204	ICAM1	8,12	0,017737918
205	PELO P	8,04	7,44422E-05
206	FKBP8	7,79	0,018545763
207	CNP Is	7,83	0,004137163
208	YTHDF2	7,97	0,000765595
209	MED9 M	7,21	0,018690934
210	DPM1 D	7,78	0,001423612
211	ACY1 c	7,92	5,50298E-06
212	SFRS3	7,53	0,061678477
213	DNAJC1	7,67	0,018478883
214	Na	7,59	0,06690589

## Anhang

215	POLR3E	7,80	1,04427E-07
216	C2orf4	7,82	1,24478E-06
217	MTHFD1	7,56	0,014893008
218	CAPZB	7,62	0,014773881
219	PSMB5	7,78	7,84821E-06
220	KDEL2	7,50	0,017079612
221	ATAD3B	7,64	0,001920587
222	SNRPB	7,51	0,013468336
223	KLHL12	7,50	0,018667315
224	C3orf1	7,49	0,018760166
225	WRNIP1	6,96	0,018470587
226	TCL1A	7,51	0,010591654
227	GDI1 R	7,65	6,30078E-07
228	YWHAE	7,52	0,01819825
229	PSMC5	7,34	0,017668204
230	KEAP1	6,86	0,01916674
231	FAM162	7,54	2,54849E-06
232	HUWE1	7,41	0,002763494
233	POLR1D	7,51	1,9959E-08
234	MED28	7,28	0,022344257
235	EBI3 I	7,32	0,019824056
236	MED24	6,81	0,01923888
237	NDUFA9	7,26	0,013284439
238	LMNB1	7,22	0,021359899
239	Na	7,36	0,055846641
240	MAP2K3	7,36	0,001978668
241	FTH1 F	7,43	1,30842E-06
242	FKBP5	7,23	0,018453583
243	PPP2R1	7,17	0,021949594
244	PEG10	6,69	0,018911412
245	DYNLL1	7,37	0,002856399
246	RPS15	7,20	0,107246433
247	MAT2A	7,12	0,018463639
248	Na	7,19	0,051397212
249	HSPH1	7,16	0,007156924
250	DAZAP1	7,20	0,052522873
251	GNAI2	7,18	0,047559168
252	MED18	7,05	0,01849147
253	MGST3	7,26	3,98314E-09
254	SCAMP3	7,15	0,019791965
255	BCKDHA	7,22	0,00309839
256	Na	6,70	0,081250221
257	UBXN1	6,98	0,018452653
258	SLC25A	6,98	0,019555812
259	DDX6 P	7,02	0,005191836

## Anhang

260	TUBA4A	6,66	0,057524638
261	EEF1G;	6,87	0,044637356
262	ARL1 A	6,88	0,018625656
263	PSMB7	6,84	0,018825208
264	AHSA1	6,65	0,084217068
265	PFAS P	6,34	0,018628945
266	PLCG2	6,99	0,000128801
267	OLA1 4	6,78	0,017089886
268	GNA13	6,65	0,07561143
269	C14orf	6,71	0,033073663
270	ACADM	6,72	0,055723433
271	RAC2 R	6,55	0,054146695
272	TIMM50	6,72	0,022954396
273	PGAM5;	6,50	0,044208753
274	MCM5 D	6,68	0,033272066
275	GFPT1	6,83	0,002126889
276	DDX26B	6,19	0,018512039
277	PIK3CD	6,19	0,019048962
278	ISOC2	6,21	0,020055303
279	COPE C	6,60	0,018711629
280	VDAC1	6,68	0,048245506
281	SLC25A	6,40	0,033047146
282	GRAP G	6,59	0,018744874
283	APOOL	6,59	0,019131526
284	RPL10	6,65	0,104503783
285	PSMB6	6,65	0,021326152
286	KPNA3	6,65	0,09425481
287	Na	6,79	1,2786E-06
288	TPP1 I	6,68	0,004370741
289	CISD1	6,64	0,045638492
290	XRN2 I	6,70	0,013606142
291	ABCD3	6,55	0,018480839
292	PSMB10	6,50	0,018757271
293	FAU ub	6,38	0,123763861
294	ACP1 I	6,43	0,024586886
295	MRPS24	6,67	0,004487308
296	ACSL1	6,85	0,017952697
297	Na	5,99	0,018634869
298	EIF3E	6,99	0,002951379
299	HIGD1D	6,49	0,073599013
300	HDAC1	6,42	0,018842253
301	EIF3F	6,62	0,023656128
302	HSP90A	5,92	0,018693892
303	Na	5,91	0,019067513
304	PDK1 c	6,39	0,018875699

## Anhang

305	MED23	5,89	0,021208481
306	ELAVL1	6,27	0,082424824
307	PFKM c	6,29	0,043328719
308	RAP1A	6,33	0,079144937
309	VAPA v	6,33	0,01857665
310	SCAF1	5,86	0,031234479
311	TOMM70	6,31	0,018562397
312	RNF126	6,53	2,20487E-06
313	TOMM22	6,26	0,074636381
314	COPS7A	6,29	0,018850211
315	DSTN D	5,79	0,018465198
316	FECH f	6,20	0,018457142
317	PSMB8	6,19	0,018504065
318	GDAP1	6,18	0,018569178
319	SEC61B	6,27	0,014894577
320	MED29	5,72	0,019210541
321	HIST2H	6,23	0,158874014
322	TRIM32	5,68	0,018549889
323	BCCIP	5,69	0,019423244
324	DDB1;L	6,52	0,042550265
325	TOMM20	6,18	0,056419463
326	FBX07	5,63	0,018782021
327	PPP2R2	5,61	0,018453162
328	SUGT1	6,06	0,018546425
329	CD74 I	5,99	0,117660925
330	ACOT8	6,05	0,020407216
331	SDHA c	6,34	0,090952458
332	EEF1E1	6,12	0,047203298
333	NUDT21	6,02	0,018651224
334	TARS c	5,55	0,01860901
335	CCT2 T	6,38	0,054076907
336	P4HA1	5,98	0,020702526
337	RPN1 D	6,25	0,056712207
338	P4HB P	6,48	0,012287537
339	SEC16A	6,27	0,000133436
340	HSPA4	6,10	0,038442139
341	ETFB I	5,92	0,018711077
342	RHOH R	5,90	0,018475566
343	SF3B14	5,98	0,073927252
344	TMCO1	5,90	0,018736436
345	RPL26L	5,89	0,05715283
346	COPZ1	5,47	0,025628993
347	RPP30	5,87	0,018560483
348	Na	5,90	0,030529254
349	LOC100	5,77	0,08813379

## Anhang

350	TRAPPC	5,86	0,018823291
351	SEC13	5,47	0,064959056
352	CMAS I	6,08	0,022631163
353	CCT7 T	6,18	0,080693017
354	ARF4 A	5,90	0,063756892
355	RNF7 I	5,82	0,018508269
356	IGHG4	5,84	0,020434172
357	ADRM1	5,77	0,014649331
358	STIP1	5,80	0,019191283
359	40057	5,90	0,028424272
360	DECR1	5,87	0,010488918
361	SFXN1	5,77	0,074898904
362	PFKP 6	5,95	0,075059651
363	PYCR1	5,30	0,020608674
364	HK2 He	5,28	0,018791826
365	PPP2CA	5,26	0,01949936
366	POLR1B	5,26	0,018481121
367	LSM12	5,24	0,018548577
368	GYG1 I	5,68	0,018451531
369	PANK4	6,11	0,015965887
370	ACOT9	5,69	0,021519409
371	NDUFA6	5,23	0,018509013
372	AKAP8L	5,73	0,031521761
373	PFKL I	5,64	0,070848858
374	RPAP1	5,85	2,05429E-08
375	MCM3 M	5,04	0,112809383
376	EIF3I	5,67	0,048976919
377	COPB2	5,15	0,019587444
378	BOLA2;	5,47	0,065886594
379	SDHA S	5,73	0,087898828
380	SRPRB	5,58	0,019560993
381	CUL1 C	5,12	0,019316852
382	MRPS10	5,14	0,025230909
383	PDHA1	5,45	0,04305481
384	BRCC3	5,10	0,018454253
385	SDF2L1	5,55	0,018617803
386	C19orf	5,55	0,020856185
387	HLA-DP	5,57	0,053989196
388	RAE1 m	5,40	0,057916513
389	Na	4,33	0,170470661
390	MAPK3	5,49	0,019078158
391	Na	5,23	3,30599E-05
392	DDX3X	5,50	0,000129697
393	MRPS28	5,03	0,020693289
394	UPF1 I	5,02	0,018736589

## Anhang

395	TECR I	5,36	0,176461393
396	LBR La	5,37	0,119296523
397	C11orf	5,69	4,15851E-05
398	YWHAG	5,43	0,090142529
399	C14orf	5,00	0,018786687
400	GMPPA	5,40	0,018812866
401	SLC25A	5,22	0,10647071
402	VPS16	4,95	0,018661599
403	MRPS14	5,37	0,02055944
404	FKBP4	4,95	0,021585067
405	STRAP	5,20	0,106545866
406	SAPS3	5,33	0,019231647
407	SLC16A	5,39	0,09557888
408	RPL35	5,07	0,304512773
409	Na	5,37	0,141382301
410	PGD 6-	5,26	0,11289035
411	KRTAP1	4,14	0,170470661
412	EIF3B	5,12	0,059994391
413	ASAH1	4,69	0,170470661
414	RARS I	5,65	0,04193264
415	TARDBP	5,25	0,088830227
416	CALU c	5,29	0,029986173
417	ATP6V1	4,83	0,019570072
418	AASDHP	5,21	0,030885726
419	YME1L1	5,23	0,019506128
420	VAPB I	5,24	0,018599208
421	TPM3 I	5,23	0,019368947
422	GNAS I	5,18	0,022422343
423	MCM4 D	4,77	0,022282479
424	- 66 k	5,47	0,031546069
425	FAF2 F	5,20	0,021197053
426	IPO7 I	4,75	0,018896973
427	ACOT7	5,08	0,090640324
428	SSBP1	5,15	0,121595264
429	LARS L	5,18	0,008607601
430	POLR3A	4,73	0,021894645
431	TARS2	5,15	0,018466619
432	RRAS2	5,15	0,01891795
433	RHOG R	5,15	0,020166276
434	GTF2F2	5,10	0,023347946
435	LOC100	5,19	0,154366475
436	CCT3 T	5,22	0,160019374
437	TUBB2C	4,85	0,004121851
438	NAP1L1	4,97	0,14369906
439	ATP5J	5,05	0,019773158

## Anhang

440	XPO1 E	4,59	0,018506509
441	CWC15	5,06	0,118980789
442	TNS3 I	4,60	0,018892008
443	GUF1 G	5,01	0,019385899
444	COPS3	4,95	0,061448331
445	DDOST	4,90	0,10874225
446	LAS1L	4,57	0,019255428
447	Na	3,83	0,170470661
448	GPS1 I	4,95	0,018777498
449	C1QBP	4,84	0,084500559
450	KRTAP1	3,81	0,170470661
451	GRHPR	4,90	0,195018772
452	PDIA6	4,46	0,128126784
453	DDX20	4,51	0,022859566
454	ATAD3A	4,89	0,000339899
455	SEH1L	4,50	0,019358239
456	SSR1 P	4,28	0,281199647
457	PECI I	4,78	0,18357844
458	EIF3G	4,95	0,034238884
459	MRPS16	4,87	0,086055268
460	ATAD1	4,46	0,021434859
461	NDUFS2	4,98	0,283626475
462	HSP90A	4,93	0,003718069
463	PSMD13	4,26	0,170470661
464	FARSA	4,94	0,000254656
465	COPG C	4,44	0,019627298
466	MAGED1	4,38	0,022414294
467	Na	3,71	0,170470661
468	MRPS11	4,43	0,121646072
469	LARP4B	4,05	0,234436756
470	ACAD11	4,37	0,019014453
471	PPP1CA	4,57	0,107591965
472	RPS29	4,33	0,181074895
473	TOMM40	4,57	0,275697829
474	GNB2L1	4,94	0,019987082
475	LOC646	4,56	0,133073713
476	Na	4,12	0,170470661
477	BANK1	4,31	0,02047939
478	TIPRL	4,73	0,018553157
479	MIF Ma	4,12	0,296970205
480	NAP1L4	4,56	0,166723404
481	VDAC2	4,96	0,099624297
482	EIF4A1	4,53	0,104993272
483	PPP1CC	4,61	0,088359361
484	AFG3L2	4,02	0,170470661

## Anhang

---

485	SFN Is	4,53	0,1786656
486	RPS28	4,49	0,310430956
487	PABPC4	4,83	0,088685455
488	DIMT1L	4,44	0,154183284
489	SSR3 c	3,94	0,170470661
490	HMGA1	4,09	0,195274282
491	UQCRC1	4,68	0,072826926
492	NDUFS3	4,63	0,295226647
493	ARHGEF	3,99	0,148549071
494	PAICS	4,43	0,176991007
495	SLC25A	4,62	0,013841135
496	PRPS1	4,69	0,054988634
497	VARS V	4,40	0,076580326
498	MRPS15	4,39	0,087860883
499	DHCR7	4,40	0,235771904
500	ATP5O	4,25	0,164712675

## 7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Eick für die vielen wertvollen Denkanstöße und Ratschläge sowie die Zeit und Geduld, die er mir während der gesamten Forschungsarbeit entgegengebracht hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Arbeitskollegen im Eick Labor, für die tolle Atmosphäre, hilfreichen Diskussionen und gegenseitige Unterstützung. Insbesondere erwähnen möchte ich Frau Dr. Michaela Rohmoser, für die geduldige und erfolgreiche Einführung in die Geheimnisse des Klonierens und bei Frau Dr. Corinna Hintermair, die mir von Beginn an zuverlässig mit Rat und Tat zu Seite stand. Bei Dr. Roland Schüller möchte ich mich bedanken, dafür dass er mich bei der Präparation der Massenspektrometrie-Proben unterstützt hat.

Dank geht auch Dr. Ignasi Forne und Andrew Flatley für die erfolgreiche Kollaboration in Rahmen dieser Arbeit.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei unserem Team aus der Spülküche für die tolle, zuverlässige Arbeit, die sie schon über Jahre am Helmholtz Zentrum leisten und dafür, dass sie mich in den Kaffeepausen in ihre Mitte genommen haben und in den richtigen Momenten mit Nervennahrung versorgt haben.

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen aus meinem privatem Umfeld und meiner Familie bedanken, die mich in den letzten Jahren immer wieder mit den richtigen Worten motivieren konnten und mich bestärkt haben meinen Weg zu gehen.