

Graduate School of Life Science



Analyse des Interaktoms des Mediator Komplexes und seiner
posttranslationalen Modifikationen in *Saccharomyces Cerevisiae*
mittels Massenspektrometrie

Proteomic Analysis of the Mediator Complex Interactome and
it's posttranslational Modifications in *Saccharomyces Cerevisiae*

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

vorgelegt von

Henriette Uthe

geboren in Sondershausen

Leipzig 2017



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Erstgutachter: Prof. Dr. Andreas Schlosser

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Wegener

Drittgutachter: PD Dr. Heike Hermanns

Prüfungsleiter: Prof. Dr. Alexander Buchberger

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Fritz

Abkürzungsverzeichnis

- 2D: 2 Dimensional 12
ABC: Ammoniumbicarbonat 52
bzw.: beziehungsweise 20
C: Carbon 18
ca.: circa 21
cDNA: complementary Desoxyribonucleic Acid 55
ChEC: Chromatin endogenous cleavage 104
ChIP: Chromatin-Immunopräzipitation 36
CID: Collision induced dissociation 16
CTD: C-Terminale Domäne 24
DMSO: Dimethylsulfoxid 48
DNA: Desoxynucleic acid 11
DTT: Dithiothreitol 50
ESI: Elektrospray Ionisierung 13
ETD: Electronic Transfer Dissociation 16
FDR: False Discovery Rate 53
FT-ICR: Fourier-Transformations Ionen
Cyclotron Resonanz 14
ggf: gegebenenfalls 12
h: hour 51
HA: Hämagglutinin 46
HCD: High Energy Collision induced
dissociation 16
HPLC: High-Pressure Liquid Chromatography 12
ICAT: Isotope-coded Affinity Tags 19
IQR: Interquartile Relation 54
iTRAQ: isobaric Tags for Relative and absolute
quantification 18
kb: Kilobasen 58
kDa: kiloDalton 31
kV: kiloVolt 13
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption 13
ml: Milliliter 46
mRNA: messenger RNA 11
MS: Massenspektrometrie 18
N: Nitrogen 18
ncRNA: non-coding RNA 19
O: Oxygen 18
OD: Optische Dichte 49
PCR: Polymerase Chain Reaction 45
PEG: Polyethylenglykol 48
PIC: Pre-Initiationskomplex 24
RNA: Ribonucleic acid 11
Rpb: RNA-Polymerase II (B) 30
rpm: rounds per minute 49
rRNA: ribosomal RNA 19
SAGA: Spt-Ada-Gcn5-Acetyl transferase 24
SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamid-
Gelelektrophorese 50
SILAC: Stable Isotopic Labeling by Amino acids
in Cell culture 18
snoRNA: small nucleolar ribonucleic acid 22
snRNA: small nuclear ribonucleic acid 22
SORB: Sorbitol 47
Sumo: Small Ubiquitinrelated MOdifier 34
TBP: TATA-Box Bindeprotein 21
TBST: Tris Buffered Saline Tween 51
TOF: Time of Flight 13
tRNA: transfer ribonucleic acid 19
UAS: Upstream Activating Sequences 24
UE: Untereinheit 79
UV: Ultraviolett 46
YPD: Yeast Extract-Peptide-Dextrose 48

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Einführung in die massenspektrometrische Proteinanalytik	11
1.1.1	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	11
1.1.1.1	Proteinpräparation, Verdau und chromatografische Auftrennung	12
1.1.1.2	Ionisierung von Peptiden	13
1.1.1.3	Die Massenanalyse	13
1.1.1.3.1	Der Quadrupol	13
1.1.1.3.2	Ionenfallen	14
1.1.1.3.3	Flugzeitmassenspektrometer- ToF (<i>Time of Flight</i>)	15
1.1.1.4	Peptidfragmentierung	15
1.1.2	Quantitative Proteinbestimmung	16
1.1.2.1	<i>Label Free Quantitation Lfq</i>	17
1.1.2.2	Stabile Isotopenmarkierung	17
1.1.2.2.1	Metabolisches Labeling	18
1.1.2.2.2	Chemische Isotopenmarkierung	18
1.2	Transkription in Hefe	20
1.2.1	RNA-Polymerase I und Transkription der rRNA	21
1.2.2	RNA-Polymerase III	22
1.2.3	RNA-Polymerase II und die Transkription der mRNA	24
1.2.3.1	Pre-Initiation am Promotor und PIC Assemblierung	24
1.2.3.2	Initiation und Elongation	25
1.2.4	Termination und Recycling	25
1.2.5	Spleißen	26
1.2.6	Chromatin	27
1.2.6.1	Chromatinstruktur	27
1.2.6.2	Chromatin Remodeling und Histonmodifikationen	27
1.2.6.3	Telomere	28
1.3	Der Mediator Komplex	30
1.3.1	Struktur und Aufbau	30
1.3.1.1	Kopfmodul	30
1.3.1.2	Mittelmodul	30
1.3.1.3	Schwanzmodul	31
1.3.1.4	Das Cdk8-Module	33
1.3.1.5	Posttranslationale Modifikationen	34
1.3.2	Funktionen des Mediatorkomplexes in der Transkription der mRNA	34
1.3.2.1	Initiation und Repression	34
1.3.2.2	Elongation	36
1.3.2.3	Termination und Reinitiiierung	37
1.3.3	Der Mediatorkomplex und das Chromatin	38
1.3.4	Der Mediatorkomplex und DNA-Reparatur	39
2	Zielsetzung der Arbeit	40
3	Material und Methoden	41
3.1	Material	41
3.1.1	Verwendete Puffer	41
3.1.2	Verwendete Plasmide	42
3.1.3	Erzeugte und verwendete Stämme	42
3.1.4	Verwendete Primer / Nukleotide	42
3.1.5	Verwendete Chemikalien	44
3.1.6	Verwendete Kits	45

3.1.7	Verwendete Enzyme	45
3.1.8	Verwendete Antikörper	46
3.1.9	Verwendete Geräte	46
3.2	Methoden	47
3.2.1	PCR-basiertes Anfügen eines Proteintags	47
3.2.1.1	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	47
3.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.1.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	47
3.2.1.4	Transformation chemisch kompetenter Zellen	48
3.2.1.5	DNA Isolierung und Kolonie-PCR	48
3.2.2	Zellkultur und Zellaufschluss	48
3.2.2.1	Zellkultur	48
3.2.2.2	Stabile Isotopenmarkierung	49
3.2.2.3	Zellernte	49
3.2.2.4	Zellaufschluss durch Kryogrinding	49
3.2.2.5	Zellaufschluss durch Glaskügelchen	49
3.2.3	Proteinanalytische Methoden	49
3.2.3.1	Immunopräzipitation	49
3.2.3.2	Bradford Assay	50
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
3.2.3.4	Western Blot Analyse	50
3.2.4	Massenspektrometrische Methoden	51
3.2.4.1	Reduzierung und Alkylierung	51
3.2.4.2	Proteinverdau im Gel	51
3.2.4.3	Proteinverdau in Lösung	52
3.2.5	Analyse der MS-Daten	53
3.2.5.1	Datenprozessierung und Datenbanksuche	53
3.2.5.2	Quantifizierung	53
3.2.6	RNA-analytik	55
3.2.6.1	RNA-Isolierung aus dem IP-Eluat	55
3.2.6.2	QuBit™ Assay	55
3.2.6.3	RNA-Sequenzierung	55
3.2.6.4	Real-Time PCR	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Methodenetablierung zur Isolierung des Mediators aus <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	57
4.1.1	Anfügen eines C-terminalen HA-Tags mittels homologer Rekombination	57
4.1.2	Optimierung der Probenvorbereitung	60
4.1.2.1	Stabile Isotopenmarkierung	60
4.1.2.2	Aufschlussmethode	61
4.1.2.3	Inkubationszeit und Waschschrte	62
4.1.2.4	Elution	63
4.2	Isolierung des Mediatorkomplexes und Identifizierung seiner Interaktionspartner	64
4.2.1	Identifizierung des Mediator-Interaktoms über HA-fusionierte Untereinheiten des Kernmediators	67
4.2.1.1	Proteine des Pre-Initiationskomplexes	68
4.2.1.2	Proteine der Transkriptionselongation und mRNA-Prozessierung	70
4.2.1.3	Histone und <i>Chromatin Remodeling</i> Komplexe	71
4.2.1.4	Polymerase I, Proteine der rRNA Synthese und Ribosomen Biogenese	73
4.2.1.5	Polymerase III	75
4.2.1.6	Retrotransponale Elemente TY1 und Ty2	75
4.2.1.7	Inosin-5´-Monophosphatdehydrogenase	77
4.2.1.8	Proteine der DNA-Reparatur und Replikation	78
4.2.1.9	Interaktom der Untereinheit Med5	79

4.2.2	Interaktionspartner des Cdk8-Mediators	79
4.2.3	Der Einfluss ausgewählter IP-Bedingungen auf das Interaktom	81
4.2.3.1	NP40 – Gehalt im Lysepuffer	81
4.2.3.2	Größe der DNA- und RNA-Fragmente	82
4.2.4	Unterscheidung von stabilen und transienten Interaktionspartnern	84
4.2.4.1	Austausch transienter Interaktionspartner	84
4.2.4.2	Verhinderter Austausch durch Glutaraldehyd Crosslinking	87
4.2.5	Der Einfluss von Rapamycin auf das Interaktom des Mediatorkomplexes	90
4.2.6	Analyse der co-präzipitierten RNA	93
4.3	Posttranslationale Modifikationen am Mediatorkomplex	94
5	Diskussion und Zusammenfassung	99
5.1	Ein Protokoll zur umfassenden Isolierung des Mediator-Interaktoms konnte etabliert werden	99
5.2	Der Mediator-Kernkomplex ist nicht flexibel zusammengesetzt	101
5.3	Das Kinasemodul ist nicht an der aktiven Transkription beteiligt	102
5.4	Der Mediator ist Bestandteil des Pre-Initiationskomplexes	102
5.5	Der Mediator-Komplex ist an der Transkriptionselongation beteiligt	104
5.6	Der Mediator-Komplex interagiert mit der Polymerase I und III	104
5.7	Der Mediator als Transkriptionsplattform	105
6	Anhang	107
6.1	Vektorkarten verwendete Plasmide	107
6.2	Methodenvalidierung	108
6.2.1	Wachstumskurve aller C-Terminal HA-fusionierter Stämme	108
6.2.2	Reproduzierbarkeit des Aufschlusses	109
6.2.3	Zellaufschluss mit Glaskügelchen	110
6.2.4	Co-Immunopräzipitation mit HA-Peptid Elution	111
6.3	Co-Immunopräzipitationen anderer Mediatoruntereinheiten	112
6.3.1	Co-Immunopräzipitation Med5-HA (Triplikate)	113
6.3.2	Co-Immunopräzipitation Med2-HA (Triplikate)	114
6.3.3	Co-Immunopräzipitation Med1-HA (Triplikate)	115
6.3.4	Co-Immunopräzipitation Med19-HA (Triplikate)	116
6.3.5	Co-Immunopräzipitation Srb9-FLAG (PAM Einzelexperiment)	117
6.3.6	Co-Immunopräzipitation Med17-HA mit DNaseI Behandlung (Einzelexperiment)	118
6.4	Co-Immunopräzipitationen anderer Proteine	118
6.4.1	Co-Immunopräzipitation Pex19-HA (Einzelexperiment)	119
6.4.2	Co-Immunopräzipitation Rpa190 (Triplikate)	120
6.4.3	Co-Immunopräzipitation Rpb3-HA (Triplikate)	121
6.5	RNA-Sequenzierung	122
6.6	Posttranslationale Modifikationen	122
6.7	Tabellen	126
6.7.1	Interaktionspartner aller Untereinheiten des Kernmoduls	126
6.7.2	Interaktionspartner der Untereinheit Srb9 aus dem Kinasemodul	149
6.7.3	Interaktionspartner Med17 mit Rapamycin	152
6.7.4	Interaktionspartner des Mediatorkomplexes (HitPredict)	158

7	Literaturverzeichnis	160
8	Affidavit	180
9	Lebenslauf - Curriculum vitae	181

Abstract

Eukaryotic messenger RNA (mRNA) synthesis catalyzed by the RNA Polymerase II is the central and critical process for the regulation of gene expression. Several decades of research unearthed many details about this essential process of high complexity and dynamic. The mediator complex turned out to be crucial for the regulation of Pol II mediated transcription, especially the process of initiation. It functions as an interface between the general transcription machinery and multiple DNA binding transcriptional regulators. Binding these regulators via its tail module and binding the polymerase II via its head module, the mediator forms a bridge between upstream activating sequences and the core promoter and initiates the assembling of the Pre-Initiation complex consisting of the polymerase II and the general transcription factors. However, particularly the last years of research suggest the mediator complex within many other functions including transcription elongation, gene looping and chromatin remodeling. Considering the facts, that the mediator (a) consist of 25 subunits, which are partially flexible associated, (b) shows a flexible intrinsic structure and (c) is highly and dynamically phosphorylated it becomes easy to imagine plausible that the mediator complex meets all this functions, by serving as a transcriptional platform. In context of this thesis, and it was possible to “illustrate” the mediator within its versatile tasks and functions by presenting the most comprehensive analysis of the Mediator complex interactome to date. By optimizing the conditions of cell lysis and co-immunoprecipitation it was possible to preserve even transient and labile protein-protein interactions. The use of metabolic labeling (^{15}N) in the control experiment, allowed us to distinguish between specific and non-specific captured proteins. In combination with high performance mass spectrometry, more than 400 proteins and even complete protein complexes interacting with the mediator complex could be identified, naming RNA-Polymerase II, all general transcription factors the SAGA complex, chromatin remodeling complexes and highly acetylated histones. Furthermore, many candidates were identified playing a role in co-transcriptional processes of mRNA, such as splicing, mRNA-decapping, mRNA transport and decay. This analysis not only confirmed several interactions, already can be found in the literature, but furthermore provide clear evidence, that mediator complex interacts not only with the RNA-Polymerase II, but also with the RNA Polymerase I and III. Next to the high numbers of potential known and unknown interacting proteins, it could be shown, that the interactome is highly dynamic and sensitive to detergent.

Kurzzusammenfassung

Die Synthese der mRNA durch die RNA-Polymerase II ist der zentrale und kritische Prozess im Rahmen der Transkriptionsregulation Protein-kodierender Gene. Viele Jahrzehnte der intensiven Erforschung brachten viele Details über diesen Mechanismus zu Tage, der von einer unglaublichen Komplexität und Dynamik geprägt ist. Dabei stellte sich heraus, dass der Mediator-Komplex eine zentrale Rolle bei der Regulation der Polymerase II-abhängigen Transkription spielt, im Besonderen der Initiation. In der Funktion einer Schnittstelle verknüpft er die allgemeine Transkriptionsmaschinerie mit den Gen-spezifischen Transkriptionsregulatoren. Durch die Interaktion des Schwanzmoduls mit diesen Regulatoren und der Interaktion des Kopfmoduls mit der Polymerase II verbindet er wie eine Brücke die oberhalb des Promotors liegenden Aktivatorsequenzen mit dem Kernpromotor und initiiert so die Ausbildung des Pre-Initiationskomplexes. Darüber hinaus mehrten sich gerade in den letzten Jahren die Hinweise darauf, dass der Mediator auch noch an anderen Prozessen der Transkription beteiligt ist. Zu diesen gehören z.B. die Elongation, die Ausbildung von Genschlaufen oder auch der Umbau der Chromatinstruktur. In Anbetracht der Tatsachen, dass der Mediator (a) aus bis zu 25 Untereinheiten mit flexibler Zusammensetzung besteht, (b) eine flexible Struktur besitzt und (c) umfassend und dynamisch über posttranslationale Modifikationen modifiziert ist, erscheint es durchaus möglich, dass der Mediator all diese Funktionen ausfüllt und die Rolle einer allgemeinen Transkriptionsplattform einnimmt. Im Zusammenhang mit dieser Dissertationsschrift ist es gelungen, den Mediator innerhalb all dieser Funktionen „abzubilden“ und die bisher umfassendste Interaktomanalyse dieses Komplexes zu präsentieren. Durch die optimierten Bedingungen der Zelllyse und Co-Immunopräzipitation, gelang es auch transiente Interaktionspartner zu isolieren. Durch das metabolische Markieren der Wildtypkontrolle konnten außerdem unspezifische und spezifische Interaktionen eindeutig voneinander unterschieden werden. Über 400 Proteine wurden als signifikante Interaktionspartner des Mediators identifiziert. Viele dieser Proteine konnten als vollständige Komplexe zusammengefasst werden, z.B. die RNA-Polymerase II, alle allgemeinen Transkriptionsfaktoren, der SAGA-Komplex, viele Komplexe des *Chromatin Remodelings* und stark acetylierte Histone. Viele weitere Interaktionspartner spielen zudem eine Rolle bei der co-transkriptionalen Prozessierung der mRNA, wie z.B. dem Splicing, dem mRNA-decapping oder Abbau. Darüber hinaus gibt es starke Hinweise darauf, dass der Mediator auch mit der Polymerase I und III interagiert und an der ribosomalen Biogenese beteiligt ist. Weitere Analysen zeigten, dass das Interaktom zudem hochdynamisch ist.

Einleitung

1.1 Einführung in die massenspektrometrische Proteinanalytik

1 Das zentrale Dogma der Biologie von Francis Crick beschreibt den Informationsfluss zwischen den Biopolymeren Desoxyribonukleinsäure (DNA, Ribonukleinsäure (RNA) und Proteinen. Die genetisch codierte Information in Form von DNA wird in eine transportable Form (*messenger RNA*) übertragen (Transkription). Dieses Transkript enthält die Information zur Synthese eines bestimmten Proteins (Translation). Mit einigen Ausnahmen dieses unidirektionalen Weges, beschreibt dieses Dogma auch noch heute die Grundpfeiler der Molekularbiologie. Auf diesem unidirektionalen Weg nimmt auch die Komplexität enorm zu. Stehen am Anfang noch circa 21.000 Protein-codierender Gene, können diese in 100.000 verschiedene mRNA transkribiert werden. Durch posttranslationale Modifikationen können daraus letztendlich über 1 Million verschiedene Proteinspezies entstehen und unterschieden werden. Je nach Altersstadium oder Gewebetyp können sich Zellen eines Organismus auf Proteinebene qualitativ wie quantitativ sehr unterscheiden. Für die Gesamtheit aller Proteine in einer biologischen Einheit (Zelle, Gewebe oder Organismus) unter genau definierten Bedingungen wurde 1996 der Begriff „Proteom“ eingeführt (Wilkins et al., 1996). Um die Komplexität und auch Dynamik des Proteoms in biologischen Systemen zu erfassen zu können, hat sich die Massenspektrometrie als unverzichtbare Methode etabliert (Yarmush and Jayaraman, 2002). Durch die exakte Bestimmung der molekularen Masse von Peptiden oder ganzen Proteinen und deren charakteristischen Fragmenten lassen sich diese aus höchst komplexen Proben identifizieren, charakterisieren und auch quantifizieren.

1.1.1 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

In der Anwendung der Massenspektrometrie auf Proteinebene unterscheidet man zwischen den Ansätzen eine Proteinprobe in Form von verdauten Peptiden zu analysieren (*bottom up* oder *shot gun*) oder die Proteine intakt zu vermessen (*top-down*). Um die Gesamtheit der Proteine in einem Organismus oder Gewebe unter definierten Bedingungen zu bestimmen, also um das sogenannte Proteom (Wilkins et al., 1996) zu bestimmen, wird in den meisten Fällen der *shot gun* Ansatz verwendet, welcher nun im Detail beschrieben werden soll (siehe Abbildung 1).

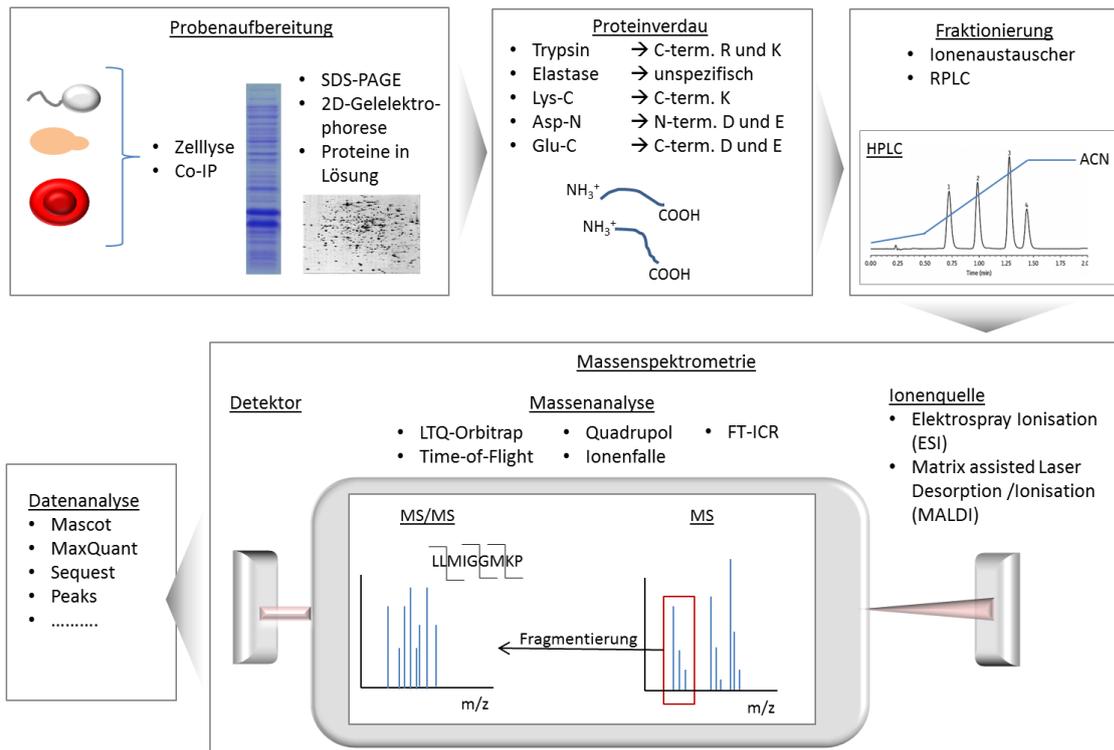


Abbildung 1 Ablauf einer typischen shot gun – Proteomanalyse. Die Proteine einer biologischen Probe werden isoliert und einem proteolytischen Verdau unterzogen. Die entstandenen Peptide werden mittels einer HPLC (*high pressure liquid chromatography*) nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt und fraktioniert. Die chromatografische Anlage ist direkt an das Ionisierungsmodul angeschlossen. Eluierte Peptide werden über Elektrospray Ionisierung (ESI) ionisiert und durch ein Massenspektrometer analysiert. Die detektierten Massen ausgewählter Peptide werden fragmentiert und ihre Sequenz an Hand der MS/MS Spektren bestimmt. Letztendlich werden die Peptidsequenzen im Rahmen der Datenanalyse mit speziesspezifischen Proteindatenbanken abgeglichen und ggf. quantifiziert

1.1.1.1 Proteinpräparation, Verdau und chromatografische Auftrennung

Aus einer biologischen Probe werden die gewünschten Proteinspezies mechanisch und/oder chemisch isoliert. Im Fall einer Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht vorsortiert, was entweder der Isolierung des Zielproteins dienen kann oder auch der Vorfraktionierung einer sehr komplexen Probe. Eine weitere Dimension der Auftrennung bietet hier die 2D-Gelelektrophorese, bei der die Proteine zusätzlich zu ihrem Molekulargewicht nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden können (O'Farrell, 1975). Die isolierten Proteine werden dem *bottom up* Ansatz typischen Verdau durch Proteasen unterzogen. Werden die Proteine innerhalb der Gelmatrix als einzelne Banden oder Spots verdaut spricht man von einem in-Gel Verdau (Shevchenko et al., 1996). Wurde keine Gelaufreinigung vorgenommen und die Proteine direkt nach ihrer Aufreinigung verdaut, spricht man von einem in-Lösungs-Verdau (zusammengefasst in Medzihradsky, 2005). Dabei stehen je nach experimentellem Ansatz mehrere Proteasen zur Verfügung, die sich in Spezifität, Effektivität und Robustheit unterscheiden. So schneidet Trypsin beispielsweise spezifisch C-Terminus nach Arginin und Lysin. Unter sauren Bedingungen entstehen so an jedem Peptid mindestens 2 positive Ladungen, eine am N-Terminus und eine durch die Seitenkette des in jedem Peptid enthaltenem Arginins oder Lysins. Die dabei entstehenden Peptide weisen eine enorme Komplexität auf, weshalb sie vor der massenspektrometrischen Analyse fraktioniert werden müssen. Dies geschieht durch eine chromatografische Auftrennung nach den physikochemischen Eigenschaften der Peptide wie Hydrophobizität oder dem Ladungszustand. In Abbildung 1 ist das Elutionsprofil während einer Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (HPLC) dargestellt. Die Peptide werden dabei auf eine Chromatographiesäule geladen und binden an das C18 Säulenmaterial. Durch den ansteigenden Anteil

an Acetonitril werden die Peptide eluiert. Weniger hydrophile Peptide lösen sich dabei zuerst und stark hydrophobe erst am Ende des Gradienten.

1.1.1.2 Ionisierung von Peptiden

In den meisten Fällen ist die chromatografische Anlage direkt an das Ionisierungsmodul des Massenspektrometers gekoppelt. Eines der am häufigsten verwendeten Ionisierungstechniken ist die Elektrospray Ionisierung kurz ESI (Fenn et al., 1989). Die eluierten Peptide gelangen noch in Lösung direkt in eine Metallkapillare, deren Spitze unter sehr hoher Spannung steht (2-6kV). Durch die hohe Spannung kommt es zur Ausbildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillarspitze und einer Gegenelektrode am Massenspektrometer. Die positiv geladenen Peptide in der Analytlösung streben innerhalb dieses Feldes der Gegenelektrode entgegen und bilden durch die Verengung der Kapillare einen positiven Ladungsüberschuss. Dadurch stoßen sie sich gegenseitig ab und treten als feines Aerosol aus der Kapillarspitze. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Größe der Tröpfchen und wieder stoßen sich die positiven Ladungen ab, was ab einem bestimmten Radius (dem sogenannten Rayleigh Limit) zu einem Zerfall des Tröpfchens in kleinere führt (Coulomb Explosion). Dieser Vorgang setzt sich idealerweise so lange fort, bis sich die Peptide einzeln und positiv geladen in der Gasphase befinden und als solche in das Massenspektrometer eintreten.

Eine weitere Ionisierungsmethode ist die sogenannte matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation kurz MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)(Hillenkamp et al., 1991). Die Peptide werden hierbei im Überschuss mit einer Matrix vermischt und auf einen Probenträger aufgetragen. Bei der Matrix handelt es sich im Rahmen der Peptidanalytik meistens um Sinapin- oder α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (Beavis and Chait, 1989). Unter Vakuum verdunstet das Lösungsmittel und es entsteht eine teilkristalline Schicht aus Matrix und Peptiden. Der Probenträger wird auf bis zu 25 kV aufgeladen mit gepulstem Laserlicht ($\lambda = 337\text{nm}$) bestrahlt (siehe Abbildung 4) Dabei absorbiert die Matrix die Energie des Lasers, verdampft größtenteils und überträgt die Energie auf die Peptide, die dabei ionisieren und in die Gasphase übergehen (Renato Zenobi and Richard Knochenmuss, 1998).

1.1.1.3 Die Massenanalyse

Grundlegend setzt sich ein Massenspektrometer aus drei Komponenten zusammen: aus der zuvor beschriebenen Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor. Dabei können verschiedene Ionenquellen modulartig mit verschiedenen Analysatoren kombiniert werden und auch mehrere Analysatoren hinter einander geschaltet werden. Sie dienen dazu, die Ionen nach ihren elektromagnetischen Eigenschaften zu separieren oder auch zu filtern. Zu den in der Proteomik gängigsten Analysatoren zählt man den Quadrupol, elektrische und magnetische Ionenfallen (Paul-Falle, Orbitrap und FT-ICR) und das Flugzeitmassenspektrometer(TOF).

1.1.1.3.1 Der Quadrupol

Der Quadrupol-Analysator wirkt im Prinzip als Massefilter. Vier hyperbolisch geformte Metallstäbe, die parallel im Kreis angeordnet sind die Elektroden (siehe Abbildung 3). An den beiden jeweils gegenüber liegenden Elektroden liegen eine positive oder eine negative Gleichspannung (+U und -U) sowie die gleiche Phase der Wechselspannung ($+V \cdot \cos 2\pi f t$ bzw. $-V \cdot \cos 2\pi f t$) mit der Frequenz f an (Friedrich Lottspeich and Haralabos Zorbas, 1998). Unter bestimmten Wechselspannungswerten werden nur Ionen mit bestimmten m/z -Verhältnissen auf stabilen oszillierenden Bahnen durch den Quadrupol gelassen. Ionen mit einem unterschiedlichen m/z -Verhältnis fliegen auf instabilen Bahnen und kollidieren mit den Metallstäben

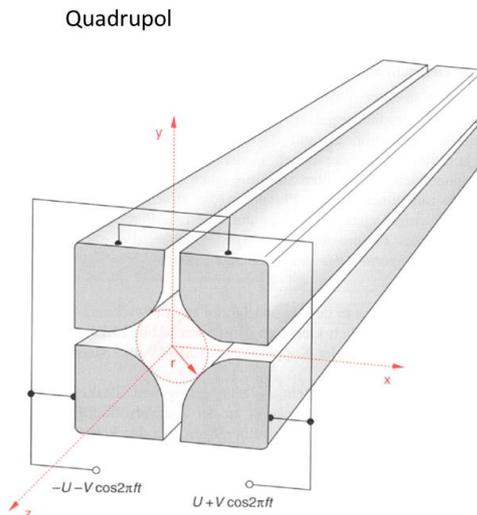


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Quadrupols
(Friedrich Lottspeich and Haralabos Zorbas, 1998)

1.1.1.3.2 Ionenfallen

Das Prinzip der Ionenfalle beruht darauf, Ionen in einem energetischen Feld zu speichern. Die 3-dimensionale Ionenfalle funktioniert nach einem ganz ähnlichen Prinzip wie der Quadrupol, nur ist das Hochfrequenzfeld hier 3-dimensional aufgebaut. Diese sogenannte Paul-Falle wurde von Wolfgang Paul entwickelt und ist aus 3 Elektroden aufgebaut (Wolfgang Paul, 1990): einer Ringelektrode, der perforierten Eintritts- und der Endkappenelektrode (siehe Abbildung 3). Sie erlaubt es Ionen eines weiten Massenbereichs innerhalb der Falle zu speichern, indem sie sich für variable Zeiten auf stabilen Bahnen in Form der sogenannten „Lissajous“- Figuren innerhalb der Falle bewegen. Das in der Falle enthaltene Helium bremst die Geschwindigkeit der Ionen und erhöht ihre Stabilität. Unter welchen Spannungen die Ionen auf diesen stabilen Bahnen kreisen, wird durch die Lösung der Mathieuschen Gleichungen beschrieben. Durch Variation der Hochfrequenzspannung verlassen die „gefangenen“ Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis die Ionenfalle über die Endkappe Richtung Detektor.

Auch die Orbitrap ist eine Ionenfalle, welche die Ionen in einem elektrostatischen Feld fängt. In der Ionenfalle befindet sich jedoch eine zentrale spindelförmige Elektrode (Abbildung 3). Die Ionen werden radial in die Orbitrap geleitet und bewegen sich dann auf Grund der elektrostatischen Anziehungskraft auf Kreisbahnen um die spindelförmige Elektrode. Gleichzeitig oszillieren sie entlang der z -Achse. Die axiale Schwingung wird als *image current* von den äußeren Elektroden detektiert, verstärkt und durch eine Fouriertransformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt. Anschließend wird das Frequenzspektrum durch eine Zweipunktkalibrierung in ein Massenspektrum umgewandelt (Scigelova and Makarov, 2006).

Das FT-ICR Massenspektrometer ist eine sogenannte magnetische Ionenfalle und vermisst die m/z -Werte der Ionen basierend auf der Zyklotronfrequenz, welche Ionen in einem fixen magnetischen Feld annehmen (Marshall et al., 1998). Die ionisierten Peptide gelangen von der Ionisierungsquelle in die sogenannte Zyklotron-Zelle in der ein extrem niedriger Druck (10^{-10} bis 10^{-11} mBar) und Temperaturen nahe dem absoluten Nullpunkt herrschen. Die Zelle befindet sich zudem innerhalb eines statischen supraleitenden Magneten (4.7 bis 15 Tesla). Basierend auf der Lorentzkraft bewegt sich ein geladenes Teilchen mit einer Ladung z und einer Masse m in einem solchen homogenen Magnetfeld B mit der Zyklotronfrequenz ω_c ($\omega_c = (z/m)B$) auf Kreisbahnen um die magnetischen Feldlinien. Durch das Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes senkrecht zum Magnetfeld kann eine Zyklotronresonanz erzeugt werden, nämlich dann wenn die eingestrahlte Frequenz des Wechselfeldes mit der Zyklotronfrequenz eines Ions übereinstimmt. Dann vergrößert sich der Zyklotronradius des Ions durch Aufnahme der Energie aus dem Wechselfeld. Die Änderung des Radius ist ein messbares Signal, welches über

Detektorplatten registriert und über eine Fouriertransformation in ein Massenspektrum übersetzt wird (Comisarow and Marshall, 1996). Diese Technik erlaubt vor allem eine sehr hohe Auflösung.

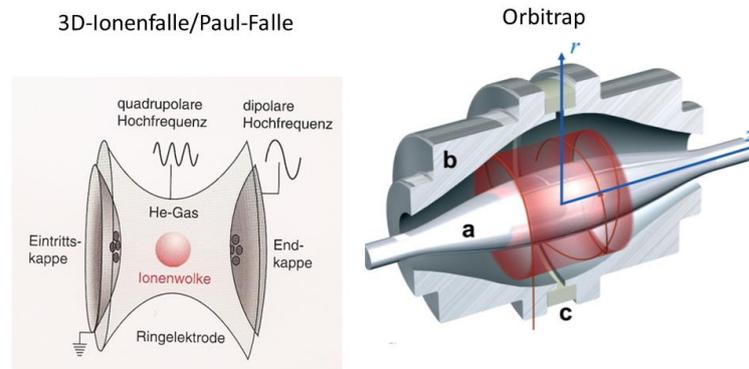


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Masseanalytoren auf Grundlage der Ionenfalle: die 3-dimensionale Ionenfalle (Friedrich Lottspeich and Haralabos Zorbas, 1998) und die Orbitrap. Orbitrap: Die Ionen bewegen sich auf Kreisbahnen um die Zentralelektrode (a) und schwingen gleichzeitig um die Z-Achse. Die Außenelektrode (b) besteht aus 2 Hälften, welche durch einen Keramikring (c) isoliert werden (Scigelova and Makarov, 2006).

1.1.1.3 Flugzeitmassenspektrometer- ToF (*Time of Flight*)

Um die ionisierten Peptide nach ihrem m/z Verhältnis aufzutrennen wird in einem Flugzeitmassenspektrometer kein elektromagnetisches Feld verwendet, sondern deren Flugzeit in einer feldfreien Driftröhre gemessen. Da sich die Kombination aus MALDI und Flugzeitmessung als besonders geeignet herausgestellt hat, wird MALDI-Massenspektrometrie fast ausschließlich mit Flugzeitmassenspektrometern verwendet. Der Laserimpuls, der für die Ionisierung der Peptide notwendig ist (siehe 1.1.1.2) bestimmt den Startpunkt der Messung. Die Ionen werden durch eine Spannung beschleunigt und treten in das sogenannte Flugrohr ein (siehe Abbildung 4). Die kinetische Energie aller Ionen mit gleicher Ladung ist nach der Beschleunigung gleich, sodass ihre Geschwindigkeit nur noch von ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis abhängt. Nach diesem Verhältnis trennen sich die Ionen während des Fluges auf; je größer das Verhältnis ist, umso langsamer bewegen sich die Ionen innerhalb der Driftstrecke und umso später treffen sie auf den Detektor (Friedrich Lottspeich and Haralabos Zorbas, 1998).

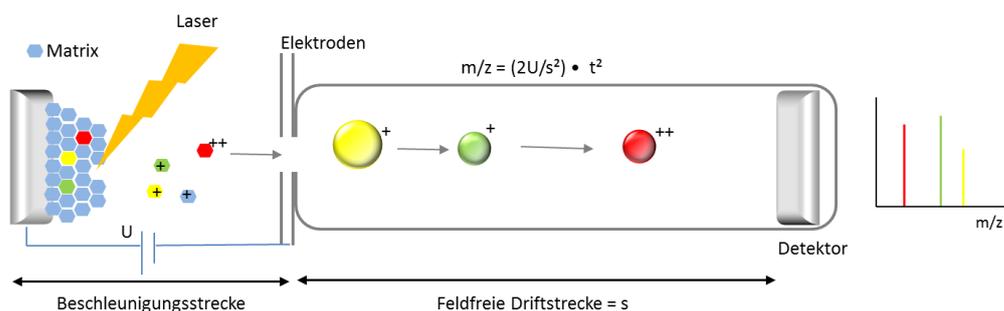


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Flugzeitmessung. Durch MALDI ionisierten Peptiden gelangen in die Gasphase und werden in einem Hochspannungsfeld beschleunigt. Die Ionen treten zum gleichen Zeitpunkt in das Flugrohr ein und trennen sich nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis auf: M-Masse, z-Ladung, U-Spannung, s-Flugstrecke, t-Flugzeit.

1.1.1.4 Peptidfragmentierung

Mit den bisher beschriebenen Techniken lassen sich die m/z Werte ionisierter Peptide messen. Die Zielsetzung beim *Bottom Up* Experiment ist es jedoch, eine komplexe Mischung aus Proteinen zu

charakterisieren, um herauszubekommen, welche Proteine sich in der Probe befinden. Dafür benötigt man nicht nur den m/z -Wert, sondern auch die Sequenz der Peptide. Diese erhält man indem das Peptidrückgrat durch Fragmentierungstechniken aufgebrochen wird die entstanden Peptidfragmente einer zweiten massenspektrometrischen Analyse (MS/MS oder MS^2) unterzogen werden. Dieser Bruch kann statistisch an 3 verschiedenen Stellen im Peptidrückgrat stattfinden (siehe Abbildung 5) und erzeugt dann eine Reihe an Fragmentionpärchen. Je nach der Position des Bruchs spricht man von der a, b, c-Fragmentserie (in Richtung N-Terminus) oder x, y, z – Serie (Richtung C-Terminus) (Biemann, 1990). Die Massendifferenz der Fragmente einer Reihe entspricht genau der Masse einer Aminosäure, was es ermöglicht die Aminosäuresequenz eines Peptides ausschließlich auf Basis seiner Fragmente zu ermitteln. Bei bestimmten Fragmentierungsarten, insbesondere bei der Verwendung höherer Kollisionsenergien, können zudem Fragmente der Seitenketten entstehen, was es zum Beispiel ermöglicht Leucin und Isoleucin voneinander zu unterscheiden (Falick et al., 1993). Man spricht in diesem Zusammenhang von *de novo*-Sequenzierung. Bei den häufigsten Fragmentierungstechniken unterscheidet man zwischen den Kollisionstechniken CID (*CID- Collision induced dissociation*) und HCD (*high-energy collision –induced dissociation*) und der *electronic transfer dissociation* Technik ETD. CID findet in der Ionenfalle selbst statt. Dabei werden Peptide mit einem bestimmten m/z Wert angeregt, in einem elektrischen Feld beschleunigt und kollidieren mit Argon- oder Stickstoffmolekülen. Dabei entstehen vor allem b und y-Ionen, die in den meisten Fällen nicht weiter fragmentieren. Die Fragmentierung bei HCD findet in einer separaten Oktopol Kollisionszelle stattfindet (Olsen et al., 2007). Hier wird eine höhere Wechselspannung angelegt als bei der CID-Fragmentierung und die Peptide prallen schneller beschleunigt auf das inerte Kollisionsgas. Auch hierbei entstehen vor allem b- und y-Ionen, aber auch weitere Fragmentierungen z.B der Seitenketten sind möglich (Olsen et al., 2009). Da bei HCD wie CID Peptidmodifikationen wie Phosphorylierungen häufig durch einen Bindungsbruch verloren gehen, eignet sich zu deren Analyse die Fragmentierungstechnik ETD (Syka et al., 2004). Hierbei übertragen radikale Anionen wie z.B Flouranthenionen (Kim and Pandey, 2012) Elektronen auf die Peptide, die daraufhin destabilisieren und fragmentieren. Dabei entstehen vor allem c- und z-Ionen und Modifikationen bleiben intakt.

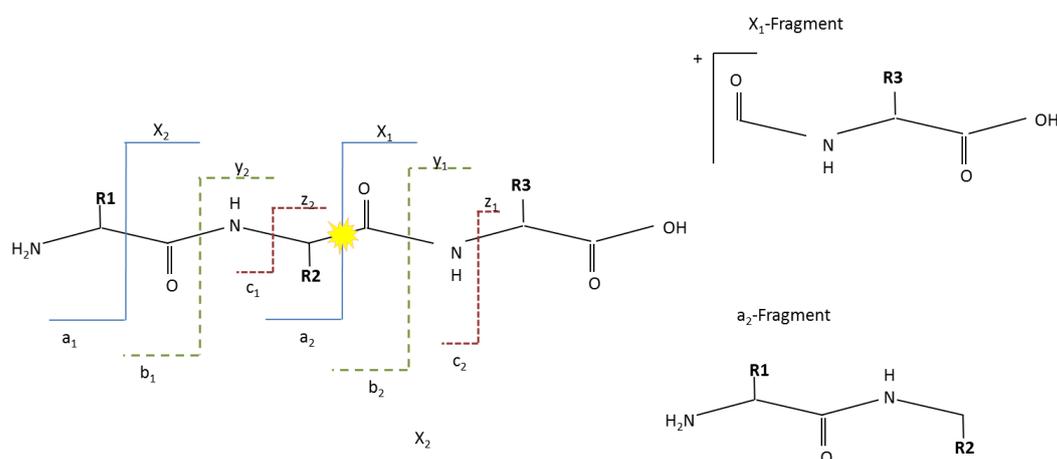


Abbildung 5 Nomenklatur der durch Kollision theoretisch entstehender Fragmentionen nach Roepstorff und Fohlmann (Roepstorff and Fohlman, 1984). Dargestellt ist die Fragmentierung, die zur Entstehung eines x- und eines a-Fragments führt.

1.1.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Proteinen in einer biologischen Probe ist ein weiterer Teilaspekt, der durch massenspektrometrische Analysen abgedeckt werden kann. So ist es möglich die relative wie auch absolute Abundanz aller detektierbaren Proteine und Peptide innerhalb einer Probe oder den quantitativen Unterschied zwischen zwei Proben oder Systemen zu bestimmen. Die quantitative Proteomik erlaubt es dadurch stimulierte Veränderungen in biologischen Systemen auf Proteinebene

zu beobachten (Bantscheff et al., 2012). Dabei kann zwischen der Veränderung der Proteinmenge und der Ausprägung von Proteinmodifikation unterschieden werden. Bei einem Massenspektrometer können jedoch keine absoluten Messwerte aufgenommen werden, daher ist es immer nötig im Vergleich zu einer Referenz zu messen. Diese Referenz kann bei einer absoluten Mengenbestimmung ein interner, genormter Standard sein, der der Probe vor der Probenaufbereitung zugesetzt wurde. Bei einer relativen Quantifizierung wird der Unterschied der Probe zu einer anderen Probe betrachtet, die absolute Menge ist dabei nicht bekannt, nur der Faktor der Änderung wird hier analysiert.

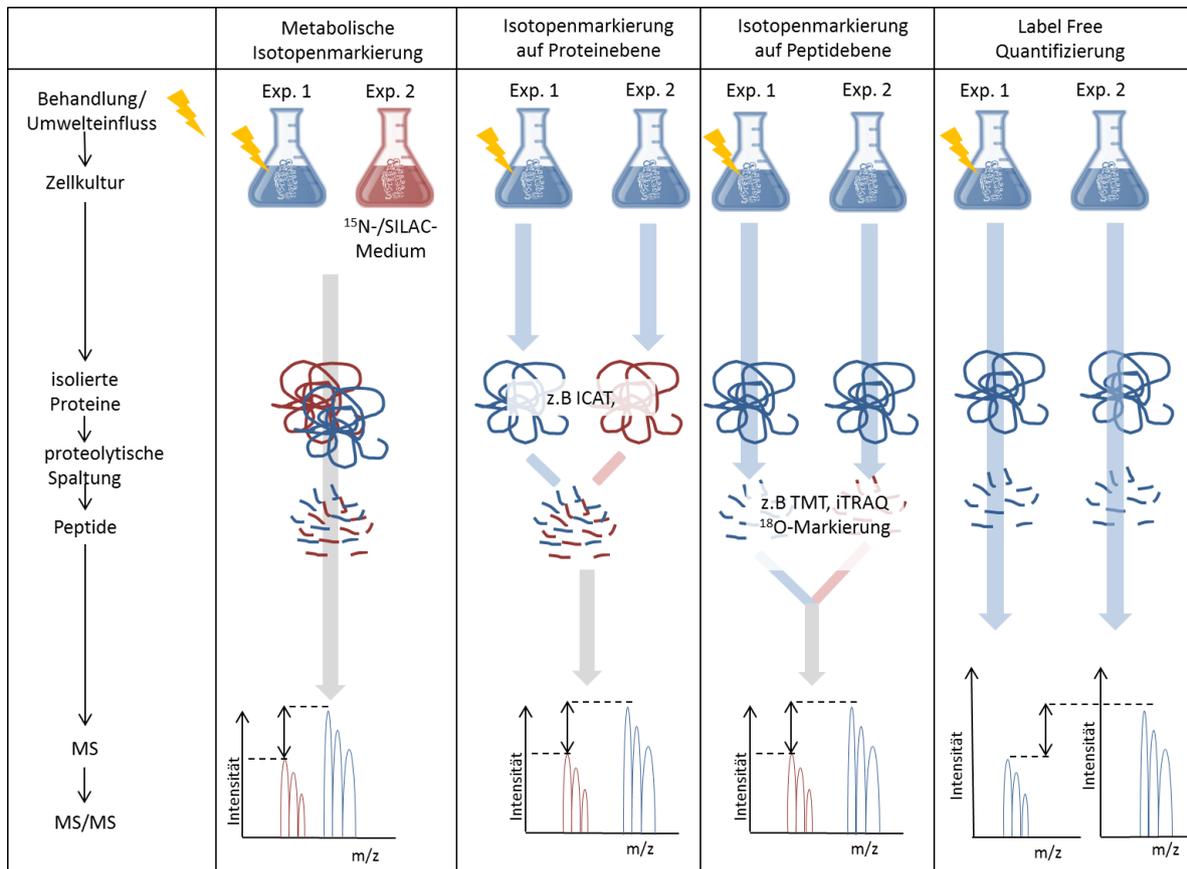


Abbildung 6 Arbeitsabläufe verschiedener relativer Quantifizierungsmethoden von Proteinen mittels Massenspektrometrie

1.1.2.1 Label Free Quantitation Lfq

Die einfachste Form der Quantifizierung mittels Massenspektrometrie stellt das labelfreie Quantifizieren dar. Die zwei miteinander zu vergleichenden Proben werden parallel aufbereitet und in zwei getrennten MS-Messungen hintereinander gemessen. Die Quantifizierung erfolgt dann entweder über den Vergleich der Signalintensitäten bzw. der Peakflächen der Peptide (Wang et al., 2003) oder der Anzahl der MS/MS Spektren (*spectral counting*), bei welchen eine Identifikation der Peptide über eine Datenbanksuche möglich war (Gao et al., 2003; Zybailov et al., 2006). Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auf kostspielige Isotopenmarkierung verzichtet werden kann. Allerdings wird die Reproduzierbarkeit solcher Experimente von der Präzision der separaten Probenaufbereitung und Vermessung sehr stark eingeschränkt.

1.1.2.2 Stabile Isotopenmarkierung

Um die Fehleranfälligkeit der relativen Quantifizierung zu minimieren, bietet es sich an die zu vergleichenden Proben möglichst früh zu mischen und als eine Probe zu bearbeiten und auch zu vermessen. Das setzt jedoch voraus, dass eine der Proben so markiert bzw. kovalent gelabelt ist, dass sie im Massenspektrum in Form einer Massendifferenz von der anderen zu unterscheiden ist. Ist das

der Fall, lassen sich die Peptide auch quantifizieren. Die verwendeten Methoden für eine solche Markierung unterscheiden sich darin, wann diese Massenmarkierung (*Labeling*) bei der Probenvorbereitung eingebaut wird und ob es sich bei der Markierung um einen stabilen Einbau von Isotopen während der Proteinsynthese selbst oder um eine Modifikation der Peptide und Proteine während der Probenaufbereitung handelt (siehe Abbildung 6).

1.1.2.2.1 Metabolisches Labeling

Beim metabolischen Markieren von Proteinen unterscheidet man zwischen dem kompletten Austausch einer Atomspezies (z.B. ^{14}N) in einer Probe durch sein Isotop (z.B. ^{15}N) und dem Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine Isotopen-markierte Variante. Im ersten Fall werden stabile schwere Isotope wie ^{15}N oder ^{13}C im Rahmen des Zellmetabolismus in alle Moleküle eingebaut. Hierfür wachsen die Zellen in den meisten Fällen in einem Medium, welches nur eine Stickstoff- oder Kohlenstoffquelle in Form eines Salzes oder Zuckers enthält welches exklusiv nur aus ^{15}N -bzw. ^{13}C Atomen besteht. Nach mehreren Teilungspassagen wird so gewährleistet, dass in allen organischen Verbindungen 95%-99.5% der Atome dem Isotop entsprechen. Diese Strategie setzt jedoch voraus, dass der verwendete Modelorganismus seinen gesamten Metabolismus mit nur einer Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle bestreiten und dementsprechend auf Minimalmedium kultiviert werden kann. Da dies nur auf Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen zutrifft, ist diese Form des metabolischen Markierens in der Praxis weitestgehend auch auf diese beschränkt.

Die andere gerade in höheren Eukaryoten beliebte Markierungsstrategie ist das sogenannte SILAC (*Stable Isotopic Labeling by Amino acids in Cell culture*) (Ong et al., 2002). Hierbei werden bestimmte Aminosäuren (meist Lysin oder Arginin) im Medium durch ^{15}N und ^{13}C markierte Isotopologe ersetzt. Mit der Voraussetzung, dass der Organismus diese Aminosäuren nicht selbst synthetisieren kann, werden nur die markierten Aminosäuren in neue synthetisierte Proteine eingebaut. Der Proteinverdau im Anschluss findet mit Trypsin statt, da diese Protease spezifisch C-terminal von Arginin und Lysin spaltet. Dadurch enthält jedes Peptid aus dem SILAC-Medium mindestens ein markiertes Lysin und/oder Arginin und kann im Massenspektrum durch die Massedifferenz von den Peptiden aus dem Kontrollmedium ohne markierte Aminosäuren unterschieden werden. Diese Methode erlaubt zwei zu vergleichende Proben schon auf der Zellebene zu vereinen (siehe Abbildung 6) und als eine Probe weiter zu verarbeiten und auch zu vermessen. Es ist jedoch zu beachten, dass sich durch die metabolische Markierung die Komplexität der MS-Spektren verdoppelt, da von fast jedem Peptid letztendlich zwei Isotopologe existieren, die auch im MS-Spektrum 2 verschiedenen Isotopenmuster ergeben. Dies kann je nach instrumenteller Ausstattung zu Lasten der Proteomabdeckung gehen (Li et al., 2012). Die metabolische Isotopenmarkierung ist zudem sehr kostenintensiv und weitestgehend auf mikrobielle Systeme und eukaryotische Zellkultursysteme beschränkt.

1.1.2.2.2 Chemische Isotopenmarkierung

Chemische Isotopenmarkierung kann auf Protein- und Peptidebene angewendet werden. Die Markierung erfolgt dementsprechend während oder nach dem proteolytischen Verdau durch chemische oder enzymatische Reaktionen.

Die sogenannten iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantification*)- Moleküle haben primäre Amine als Targets. Sie werden nach dem Verdau eingesetzt und binden kovalent an die N-Termini und Lysine der entstandenen Peptide. Die Moleküle setzen sich aus zwei strukturellen Einheiten zusammen, der aminspezifischen reaktiven Gruppe und dem isobaren Tag (Abbildung 7) Der isobare Tag wiederum besteht aus einer Reportergruppe mit einer variablen Zusammensetzung von $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ und ^{18}O -Atomen und einer Ausgleichsgruppe, die durch ihre molekulare Zusammensetzung wiederum dafür sorgt, dass die Gesamtmasse des Tags immer gleich ist. Peptide aus unterschiedlichen Proben und demnach mit unterschiedlichen Markierungen haben im (ersten) MS-Spektrum dieselbe Masse. Erst im MS^2 -Spektrum wird auch der Tag fragmentiert und die verschiedenen

Isotopenkombinationen sind anhand ihrer Massedifferenz unterscheidbar. Die Intensitäten dieser Fragmente oder Reportergruppen werden dann für die Quantifizierung genutzt (Ross et al., 2004).

Beim Labeling mit den sogenannten *Isotope-coded Affinity Tags* - ICAT (Shiio and Aebersold, 2006) reagieren die reduzierten Cysteinreste der Peptide oder Proteine mit dem Markierungsreagenz. Dieses Reagenz besteht aus einer reaktiven Iodacetamid-Gruppe, einem Linker, der durch die Verwendung von Deuterium die Massedifferenz ausmacht und einem Affinitätstag- Biotin. In seiner schweren Variante besitzt es statt normalem Wasserstoff 8 Deuterium Atome, was zwischen denselben Peptiden aus unterschiedlichen Proben zu einer Massedifferenz von 8 Da im MS-Spektrum führt. Da nicht alle Peptide Cystein enthalten, werden die modifizierten Peptide über den Biotintag angereichert. Proteine, die kein Cystein enthalten, können damit nicht quantifiziert werden.

Das ^{18}O -Labeling bietet die Möglichkeit Peptide C-Terminal mit ^{18}O -Atomen zu markieren. Dies kann entweder während des proteolytischen Verdau in Anwesenheit von H_2^{18}O selbst (Sharon et al., 1962) oder säurekatalysiert (Yao et al., 2001) geschehen. Wie viele ^{18}O -Atome beim enzymatischen Verdau eingebaut werden, ist je verwendeter Protease unterschiedlich, so sind es bei Asp-N nur ein Atom (siehe Abbildung 7). Interagieren die Proteasen (z.B. Trypsin) jedoch auch mit der freien C-terminalen Carboxylgruppe, werden beide Sauerstoffatome ausgetauscht (Stewart et al., 2001). Bei der säurekatalysierten Modifizierung werden die Proteine oder Peptide unter sauren Bedingungen in ^{18}O -haltigem Wasser inkubiert (Haaf and Schlosser, 2012; Niles et al., 2009). Dabei werden zusätzlich auch die Sauerstoffatome aus den Carboxylgruppen der Glutamin- und Asparaginsäure ausgetauscht.

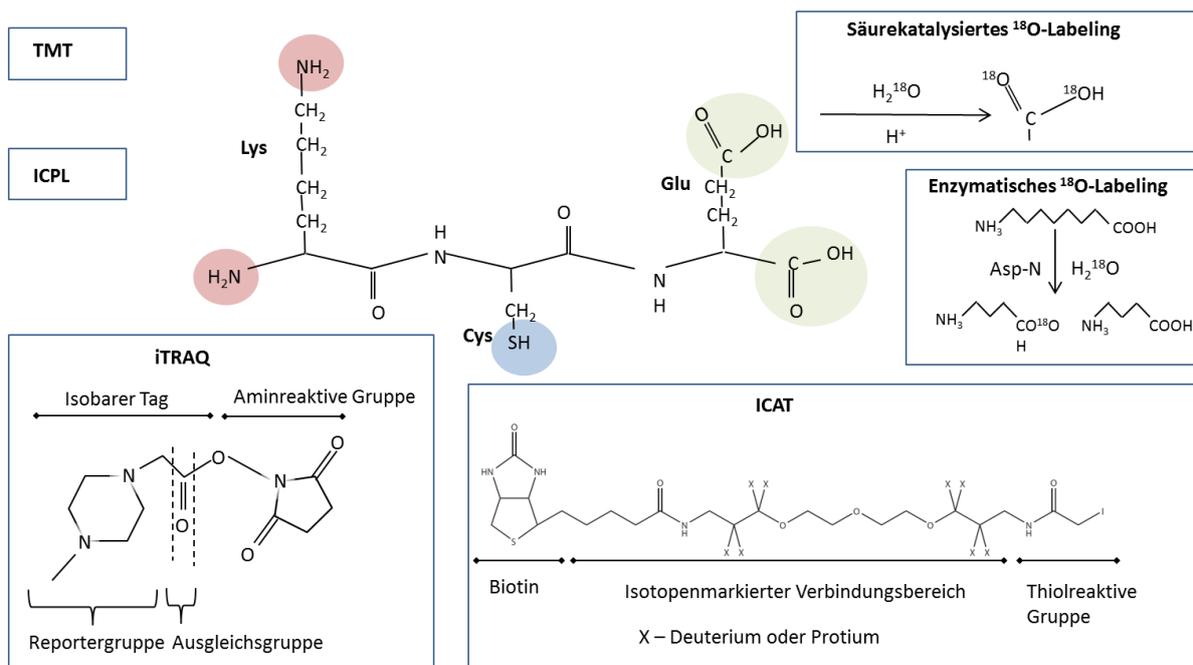


Abbildung 7 Ansatzpunkte im Peptid für ausgewählter Methoden des chemischen Labelings mit stabilen Isotopen. Die iTRAQ/TMT und ICPL-Moleküle reagieren mit den primären Aminen des N-Terminus oder der Lysinreste (rot), während die reaktive Gruppe des ICAT Reagenz nur mit reduzierten Cysteinresten reagiert(blau). Beim ^{18}O -Labeling werden die Carboxylreste der C-Termini und sauren Aminosäuren (grün) enzymatisch oder säurekatalysiert modifiziert. (modifiziert nach Erik Haaf, 2012)

1.2 Transkription in Hefe

Die Transkription von Genen beschreibt im Allgemeinen die Interpretation des genomischen Inhalts. Über DNA-abhängige RNA-Polymerasen werden Abschnitte des Genoms in Form von RNA kopiert. Einige dieser RNA-Kopien wie tRNA, rRNA und ncRNA sind selbst schon die Endprodukte der Genexpression. Im Gegensatz dazu dient die mRNA als Template für die Ribosomen-vermittelte Synthese von Enzymen, Hormonen, Strukturproteinen und vieler anderer Proteine. Die Transkription aller Gene ist ein hochkomplexer, stark regulierter Prozess und lässt sich in 5 Teilprozesse unterteilen: Pre-Initiation, Initiation, Elongation, Termination und Recycling. Die Transkription aller 3 RNA-Polymerasen ist von vielen regulatorischen Proteinen und Proteinkomplexen abhängig. Dazu zählen Aktivatoren, Repressoren, allgemeine Transkriptionsfaktoren und die Co-Faktoren (Lemon and Tjian, 2000).

Pol II	Pol I	Pol III
Rpb1	A190	C160
Rpb2	A135	C128
Rpb3	AC40	AC40
Rpb11	AC19	AC19
Rpb9	AC12	C11
Rpb5	Rpb5	Rpb5
Rpb6	Rpb6	Rpb6
Rpb8	Rpb8	Rpb8
Rpb10	Rpb10	Rpb10
Rpb12	Rpb12	Rpb12
Rpb4	A14	C17
Rpb7	A43	C25
	A49 (N-term. Domäne)	C37
	A34.5	C53
		C82
	A49 (C-term. Domäne)	C34
		C31

Tabelle 1 Untereinheiten und Homologe der drei DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in *Saccharomyces cerevisiae*. Untereinheiten, die in mehreren Polymerasen vorkommen sind in Fett gehalten. Adaptiert nach (Engel, 2013)

In Bakterien und Archaeen wird die gesamte RNA von einer RNA-Polymerase synthetisiert. In Eukaryoten wird diese Aufgabe unter 3 verschiedenen Polymerasen aufgeteilt: Die Polymerase I und III transkribieren nicht-codierende rRNA und tRNA. Die Polymerase II ist für die Transkription der Protein-codierenden mRNA verantwortlich. Die drei eukaryotischen DNA-abhängigen RNA Polymerasen sind strukturell eng miteinander verwandt. Fünf Untereinheiten (Rpb5, 6, 8, 10 und 12) sind in allen 3 Komplexen enthalten und zwei weitere Untereinheiten nur in der Polymerase I und III identisch (Tabelle 1). Die großen Untereinheiten aller drei Polymerasen bilden das katalytische Zentrum, bestehend aus der Pore für die Nukleotidtriphosphate und den Bindungsstellen für das DNA-RNA Hybrid im Elongationskomplex. Im Gegensatz zu der Polymerase II jedoch verfügen die Polymerase I und auch die Polymerase III über einen zusätzlichen Subkomplex A49/A34.5 bzw. C37/C53.

1.2.1 RNA-Polymerase I und Transkription der rRNA

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase I in Hefe hat 14 Untereinheiten und eine Größe von ungefähr 600kDa. Sie synthetisiert ausschließlich ribosomale RNA, die während der logarithmischen Wachstumsphase 60% der gesamten Transkription in der Zelle aus (Warner, 1999). Transkribiert wird dabei immer das gleiche primärem 35S Transkript (Abbildung 8), welches co-transkriptional modifiziert und in 25S, 5.8S und 18S rRNA prozessiert wird (Kos and Tollervey, 2010) Die Synthese der 5S rRNA erfolgt am gleichen Genbereich jedoch durch die Polymerase III. Die Synthese und Prozessierung der rRNA sowie das Zusammensetzen der Ribosomen findet im Nukleolus statt. Dieses Zellkompartiment bildet sich nur, wenn rDNA transkribiert wird (Nomura, 2001). Die entsprechenden Gene (rDNA) sind in Hefe als Tandems angeordnet und bestehen aus circa 150 Wiederholungen. Zwischen jedem codierenden Bereich befindet sich dazu noch nicht-codierende DNA (*intergenic spacer* - IGS), welche eine große Rolle in der RNA Synthese und dem rDNA Silencing spielt. In diesem Bereich findet man zudem den rDNA Promotor, Enhancer- und Terminationselemente. Für die Ausbildung des Pol I-Pre-Initiations-Komplexes sind neben der Polymerase I selbst das Tata-Box-Bindeprotein (TBP) der Kernfaktor (*core factor* CF, bestehend aus Rrn6, Rrn7 und Rrn11) und der *upstream activating factor* (UAF, bestehend aus Rrn5, Rrn9, Rrn10, UAF30, H3 und H4) nötig. Von den ca. 150 Wiederholungen sind nicht alle aktiv; in einer typischen Hefezelle werden auch in der exponentiellen Wachstumsphase nur die Hälfte aller rDNA Gene transkribiert (Warner, 1989), Die Stilllegung der anderen erfolgt meist durch Deacetylierungen und Hypermethylierungen der Histone (Lawrence et al., 2004). Eine wichtige Rolle spielt dabei der RENT Komplex. Dieser besteht aus seinem zentralen Protein Net1, der Histondeacetylase Sir2 und CDC14. Net1 hat mehrere Funktionen: Zum einen lokalisiert es Sir2 und Cdc14 zur rDNA worauf die Stilllegung der Gene erfolgt (Straight et al., 1999). Zum anderen rekrutiert Net1 die Polymerase I zur rDNA und aktiviert direkt die rRNA Synthese. (Shou et al., 2001). Auch die Lokalisierung des rRNA-prozessierenden Enzyms Nop1 in den Nucleus, wird durch Net1 reguliert (Straight et al., 1999). Aktiv transkribierte Gene sind frei von Histonen und stattdessen mit dem Protein Hmo1 bedeckt (Gadal et al., 2002) .

Co-transkriptional assoziiert das Primärtranskript auch schon mit den ersten Proteinen. Dabei bilden sich die sogenannten Pre-Ribonucleoprotein Partikel (pre-rRNPs) mit einer Größe von 35S. Die Pre-rRNA hat dabei noch eine Länge von 6600 Basen. Innerhalb weniger Minuten nach der Transkription und auch währenddessen beginnt die Prozessierung in Form der Generierung des 3'-Endes durch die RNase III und Endonuklease Rnt1 (Kufel et al., 1999). Das 5'-Ende wird in 2 Schritten verkürzt wobei der pre-rRNP 32S entsteht. Im Anschluss entsteht durch die Spaltung der pre-rRNA ein 20S und ein 27S ribosomaler Ribonucleoproteinpartikel. In Form von 43S und 66S Partikeln werden die pre-rRNA's aus dem Nukleolus in das Cytoplasma transportiert (Udem and Warner, 1973). Die Zwischensequenzen ITS1 und ITS 2 werden von der RNase MRP entfernt (Lygerou et al., 1996).

Die meisten rRNA-Modifikationen sind Methylierungen an der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose (2'-O-Methylierung) und die Konversion spezifischer Uridinreste in Pseudouridin. Diese Modifizierung findet sowohl post- als auch co-transkriptional statt (Osheim et al., 2004). Gesteuert und katalysiert werden diese Vorgänge durch über 150 verschiedenen RNA Spezies, sogenannte *small nucleolar RNAs* (snoRNA) welche transient an die Prä-RNA binden können. In Verbindung mit Proteinen werden diese dann auch als snoRNPs bezeichnet. Ein prominenter Vertreter dieser snoRNP's ist das Enzym Fibrillarin, welches für die 2'-O-Methylierung verantwortlich ist. Man unterscheidet zwei Klassen an snoRNP's: H/ACA box snoRNP's katalysieren die Pseudouridylierung an 44 Stellen der rRNA während die C/D snoRNPs die 2'-O-ribose Methylierung an 67 Stellen katalysieren.

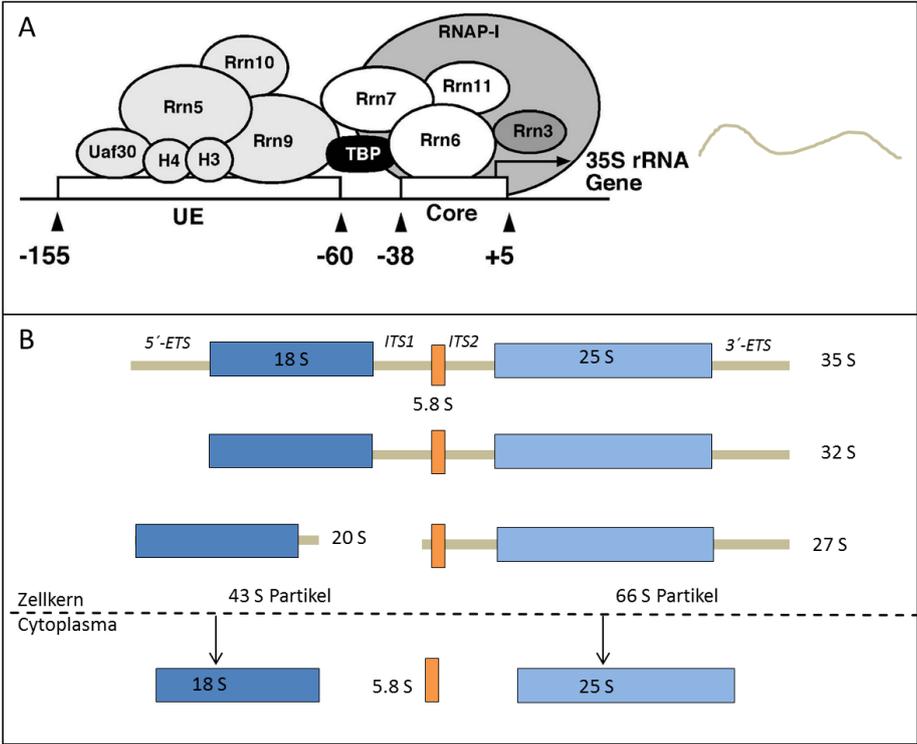


Abbildung 8 Transkription der Polymerase 1 **A** Schematische Darstellung des Pol I-Promotors und Transkriptions-faktoren: *Upstream activating Factor* (UAF) bestehend aus Rrn5, 9 10 und Histon H3 und H4, das Kernelement bestehend aus Rrn6, 7, 11; das Tata-Box-Bindeprotein(TBP) und Rrn3 (Meier and Thoma, 2005). **B** Schematische Darstellung des 35S-Primärtranskripts und dessen co-transkriptionale Prozessierung.

1.2.2 RNA-Polymerase III

Die Polymerase III transkribiert nur nicht codierende RNA wie tRNA, die 5S-rRNA, snRNA und snoRNA. Zum Pre-Initiationskomplex der Polymerase III gehören die allgemeinen Faktoren TFIIIA, TFIIIB und TFIIIC, wobei TFIIIA nur für die Transkription der 5S-RNA benötigt wird (Klekamp and Weil, 1982) Das TATA-Box-Bindeprotein ist auch für die Polymerase III essentiell und ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors TFIIIB (Kassavetis and Geiduschek, 2006). Die Promotorstruktur unterscheidet sich stark von Pol II-abhängigen Genen, so befinden sich die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren innerhalb des Genkörpers (Orioli et al., 2012). Die Promotorelemente umfassen die sogenannten A, B und C Boxen. Basierend auf der Komposition und Position dieser Promotorelemente, lassen sich 3 Pol III – Promotorkategorien unterscheiden (Abbildung 9).

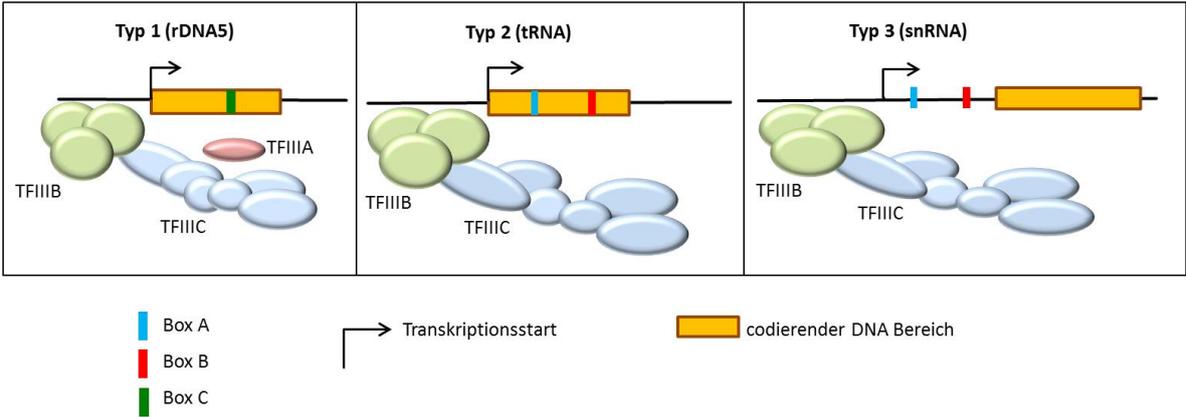


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Promotorstruktur der Polymerase III

Am Promotor des Gens für die 5s RNA (Kategorie 1), ist die Interaktion des Transkriptionsfaktors TFIIIA für eine Assemblierung des Pol II PIC notwendig. TFIIIA bindet an den Bereich um die 14 Nukleotid lange C-Box (Chalice and Segall, 1989).. Daraufhin wird TFIIIC rekrutiert und die Assemblierung des Transkriptionsfaktors TFIIIB vor dem Transkriptionsstart wird eingeleitet. Mit der Bindung der Polymerase III ist die Pre-Initiation abgeschlossen und die Transkription startet. Die Transkriptionsinitiation von t-RNA und snRNA Genen (Kategorie 2 und 3) beginnt mit der direkten Bindung des TFIIIC an die Promotorelemente A- und B-Box. Diese liegen bei snRNA Genen außerhalb des codierenden Bereichs.

Die Primärtranskripte der Polymerase III werden prozessiert und modifiziert. Dabei wird die tRNA auf eine Länge von ungefähr 75-80 Basen zurechtgeschnitten (Trotta et al., 1997). Die Pre-tRNA enthält eine 5'-Leader Sequenz und eine 3'-Trailersequenz. Die 5'-Leadersequenz wird von Ribonuclease P (RnaseP) entfernt (Abbildung 10). Daraufhin wird die tRNA vom Nucleolus in das Kernplasma transportiert. Dort bindet das Protein Lhp1 an die Poly-U Sequenz am 3'- Terminus und erleichtert damit der Endonuklease Trz1 das Entfernen diese Sequenz. An diesem Terminus ist für alle gereiften tRNA die Sequenz CCA typisch, an der die Bindung mit der jeweiligen Aminosäure erfolgt. Diese Sequenz wird schrittweise durch sogenannte CCA-Enzyme Template unabhängig an den 3'-Terminus synthetisiert (Deutscher, Murray P., 1982). Des Weiteren werden viele Nukleotide (etwa 10%) einzeln posttranskriptional modifiziert. Über 85 verschiedene Modifikationen der tRNA sind bekannt und mindestens ebenso viele Enzyme sind dabei involviert (ausführlicher beschrieben in (El Yacoubi et al., 2012)).

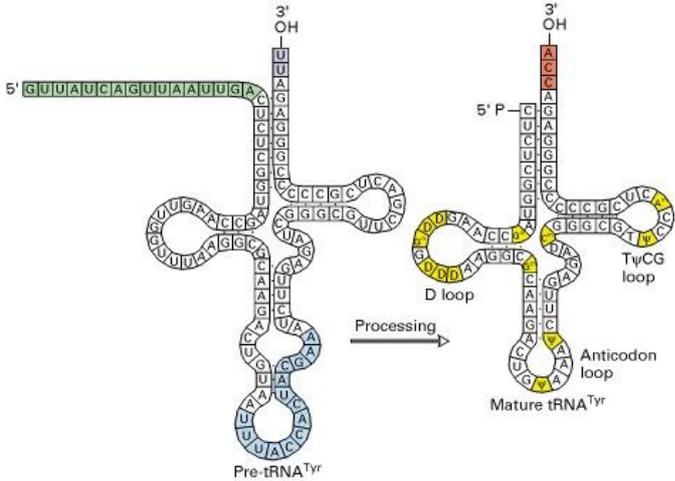


Abbildung 10 Prozessierung der tRNA (Lodish H et al., 2000) Die 5'-Leader Sequenz (grün) kann eine variable Länge haben und wird von der Ribonuklease RnaseP entfernt.

1.2.3 RNA-Polymerase II und die Transkription der mRNA

Die RNA-Polymerase II besteht aus 12 Untereinheiten, die von der größten bis zu kleinsten durchnummeriert sind Rpb1-12. Strukturspezifisch für die Pol II ist der C-Terminus der Untereinheit Rpb1. Dieser enthält eine mehrfache Wiederholung der Aminosäuresequenz $Y_1S_2P_3T_4S_5T_6S_7$ und bildet die sogenannte unstrukturierte C-terminale Domäne (CTD) (Sikorski and Buratowski, 2009). Als Target für verschiedene Kinasen spielen die 3 Serinreste an den Positionen 2, 5 und 7 dieser Sequenz eine essentielle Rolle in der Regulation der Transkription. So ist die Polymerase II innerhalb des Pre-Initiationskomplex an der CTD unphosphoryliert. Während der Initiation werden die Serinreste 5 und 7 durch die Kinase Kin28/Cdk7 (Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIIF) phosphoryliert (Feaver et al., 1994). Der Serinrest an der Position 2 erhält seine Phosphorylierung beim Übergang in die Elongationsphase durch die Kinasen Ctk1 und Bur1 (Buratowski 2009, Liu et al 2009). Der Grad der Phosphorylierung der CTD wird in allen eukaryotischen Zellen präzise moduliert und bildet eine wichtige Schnittstelle für viele Faktoren, die an die Polymerase assoziieren.

1.2.3.1 Pre-Initiation am Promotor und PIC Assemblierung

Die Pre-Initiation kennzeichnet sich durch die Assemblierung aller für den Transkriptionsstart nötigen Proteine an der Promotorregion aus. Dies umfasst mehrere Proteinkomplexe und wird als Pre-Initiationskomplex (PIC) bezeichnet (Hahn, 2004). Klassischerweise besteht ein Promotor der Klasse II-Gene aus einem TATA-Box-Element, der Initiationsstelle für die Transkription (INR), Strangabwärtsliegenden Promotorelementen, dem Motiv 10 Element und der TFIIB Erkennungsstelle. Diese minimale Zusammensetzung nennt man auch Kernpromotor (Butler and Kadonaga, 2002). Genspezifische Aktivatoren binden an regulatorische Elemente außerhalb der Kernpromotorregion. Diese Bindungsstelle befindet sich vor dem Transkriptionsstart- sozusagen „stromaufwärts“, weshalb man sie auch als *Upstream Activating Sequences* (UAS) bezeichnet.

Damit die Polymerase II jedoch die Promotorregionen bindet, bedarf es der allgemeinen Transkriptionsfaktoren: TFIIA, B, D, E, F und H (Conaway and Conaway, 1993). TFIID, welches das TATA-Box bindende Protein enthält, bindet an die TATA-Box und und die INR ermöglicht es TFIIA strangaufwärts ebenfalls an die DNA zu binden. Die Interaktion zwischen TBP und dem TFIIA erhöht zusätzlich die Affinität des TBP zur DNA (T. D. Pollard and W. C. Earnshaw, 2008) und führt zu einem Knick in der Promotor DNA. Im nächsten Schritt bindet TFIIB und stabilisiert den ganzen Komplex (Kostrewa et al., 2009). Durch TFIIB wird die Polymerase II zusammen mit TFIIF an den Promotor rekrutiert. Die Bindung von TFIIE wiederum stabilisiert die Bindung der Polymerase II an das DNA Template. Durch das Hinzukommen der ATPase und Helicase TFIIF ist der Pre-Initiationskomplex (PIC) komplett. TFIIF und TFIIF sind am „Aufschmelzen“ der Promotorregion verantwortlich, was bedeutet, dass ein 11-15 Nukleotid langer Bereich der doppelsträngigen DNA geöffnet wird und sich eine „Transkriptionsblase“ oder ein sogenannter offener Komplex bildet. Dieser wird von den Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIE stabilisiert (Kostrewa et al., 2009). Alternativ kann die Assemblierung des PIC auch über den SAGA-komplex initiiert werden. Dies ist jedoch nur für 10% aller Gene in Hefe der Fall (Basehoar et al., 2004) und betrifft in der Regel hochregulierte Gene, die generell der Stressantwort dienen (Huisinga and Pugh, 2004). In diesem Fall wird der SAGA-Komplex über einem Aktivator, der an einer UAS bindet rekrutiert. Dann erfolgt die Rekrutierung und Bindung des TBP am Kernpromotor (Bhaumik and Green, 2001).

1.2.3.2 Initiation und Elongation

Die Initiation beginnt mit der Bildung der ersten Phosphodiesterbindung zwischen den beiden ersten RNA-Nukleotiden. Die Verlängerung der mRNA ist vor allem davon abhängig, dass die Nukleosomen nach der Promotorregion aufgelockert werden und eine DNA-abhängige Prozessierung der Polymerase II überhaupt möglich wird. Zu diesem Zeitpunkt ist der Komplex aus Polymerase II und Transkriptionsfaktoren immer noch nicht sehr stabil, weshalb es oft passiert, dass die RNA-Polymerase nach wenigen aneinander synthetisierten Nukleotiden stoppt und von der DNA ab dissoziiert. DST1 oder TFIIS ermöglicht es der Polymerase II die Blockade zu überwinden (Wind and Reines, 2000). Um die Elongation der Transkription jedoch durch Chromatinstrukturen zu unterstützen bedarf es anderer Faktoren, wie dem DSIF- (Spt4 und Spt5) und dem FACT Komplex. Des Weiteren müssen verschiedene Prozesse wie das Spleißen, 5'-Capping und die Poly-Adenylierung koordiniert werden. Eine wichtige Rolle bei der Regulation spielt die C-terminale Domäne der Pol II Untereinheit Rpb1. Während der Rekrutierung und Pre-Initiation ist diese unphosphoryliert. Unmittelbar nach der Initiation wird der Serinrest Nummer 5 (Ser5) von der Kinase Kin28, eine Untereinheit des THIIH phosphoryliert (Feaver et al., 1994). Während des Übergangs zur produktiven Elongation werden die Serin-2-Reste der CTD sowie die Spt5-Untereinheit des negativen Transkriptions-Elongations-Faktors DSFI durch die Kinasen Bur1 und Ctk1 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wiederum ist essentiell für die Rekrutierung von Elongationsfaktoren wie dem FACT-Komplex, dem COMPASS-Komplex, dem PAF-Komplex und dem *mRNA-decapping enzyme*. Diese erste Modifikation an der nascenten mRNA dient der Stabilisierung der 5'-Tri-Phosphatgruppe (Muthukrishnan et al., 1975; Nuss et al., 1975). Hierfür entfernt eine RNA-Triphosphatase ein terminales Phosphat und eine RNA Guanyltransferase verknüpft ein Guanosinmonophosphat mit dem 5'-Ende der mRNA. In einem letzten Schritt wird dieser Guanosinrest an der N7-Position methyliert (Shuman and Schwer, 1995). Die entsprechenden Enzyme sind schon vor dem Transkriptionsstart über die C-Terminale Domäne an der Polymerase II assoziiert (Cho et al., 1997).

1.2.4 Termination und Recycling

Die Termination stellt einen weiteren essentiellen Prozess der Transkription dar. Die Transkription muss gezielt gestoppt, die mRNA von der Polymerase gelöst und die entstandene mRNA für den Transport aus dem Zellkern stabilisiert werden.

Für die meisten mRNA Gene liegen die Terminationssignale außerhalb des codierenden Bereiches. Zum einen befindet sich am 5'-Ende des Gens eine Wiederholung von vielen Adeninen – das sogenannte Poly-A-Signal. Des Weiteren dienen auf dem Transkript die Konsensus Sequenz AAUAAA und oberhalb dessen ein G/U-reiches Element als Terminationssignale. Sobald die Polymerase II die Sequenz AAUAAA transkribiert hat, wird diese Sequenz vom *cleavage and polyadenylation specific factor*, kurz CPF erkannt und gebunden (Nag et al., 2007). Dadurch wird die Polymerase II zum Pausieren gebracht. Das G/U-reiche Element wird vom *cleavage-stimulation factor* (CstF/CFIA) erkannt. Die CPF Endonuclease Ysh1 spaltet das Transkript am Bereich der Poly(A) Stelle (Garas et al., 2008), wobei eine freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende des Transkripts entsteht. An diese werden mehrere Adenosinreste durch die Poly(A)-Polymerase Pab1 hinzugefügt. Nach einer Verlängerung um 11 Adeninmoleküle bindet das Protein PABNP1 (*Poly(A)-binding protein nuclear 1*). Innerhalb des Komplexes aus CPSF-PAP-PAPBN1 wird die Poly(A)-Polymerase in einen prozessiven Zustand überführt und synthetisiert 40 bis 70 weitere Adenine an den 3'-Terminus der mRNA (Lemay et al., 2010). Die freie 5'-Phosphatgruppe am Überrest des Transkripts an der Polymerase wird von der 5'-3'-Endonuklease Rat1 erkannt, welche das Transkript bis zur pausierenden Polymerase II degradiert (Kim et al., 2004). Durch die hinzukommenden Faktoren Rai1 und Rtt103 wird die Polymerase komplett von der DNA gelöst. Man bezeichnet diesen Mechanismus auch als „Torpedo“-Mechanismus. Das Heptapeptid der C-terminale Domäne der Polymerase II ist zum Zeitpunkt der Termination weitestgehend am Serin 2 aber auch noch am Serin 5 phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen werden von den Phosphatasen Fcp1 (Serin 2) und Ssu7 und

Rtr1(Serin 5) entfernt und die Polymerase kann hypophosphoryliert wieder in einen neuen Transkriptionszyklus starten (Cho et al., 2001; Krishnamurthy et al., 2004; Mosley et al., 2009) Bei einer bisher unbekannt Anzahl von Genen ist die Terminationsregion über einen DNA-Schleife mit der Promotorregion verbunden. Diese Loopstrukturen finden sich bei aktiven und auch inaktiven Genen (O'Sullivan et al., 2004) und werden in Abhängigkeit von TFIIB und Ssu72 gebildet. Durch die direkte Verbindung von Transkriptionsstart und –ende ist eine schnelle Re-initiation der Transkription möglich (Tan-Wong et al., 2009).

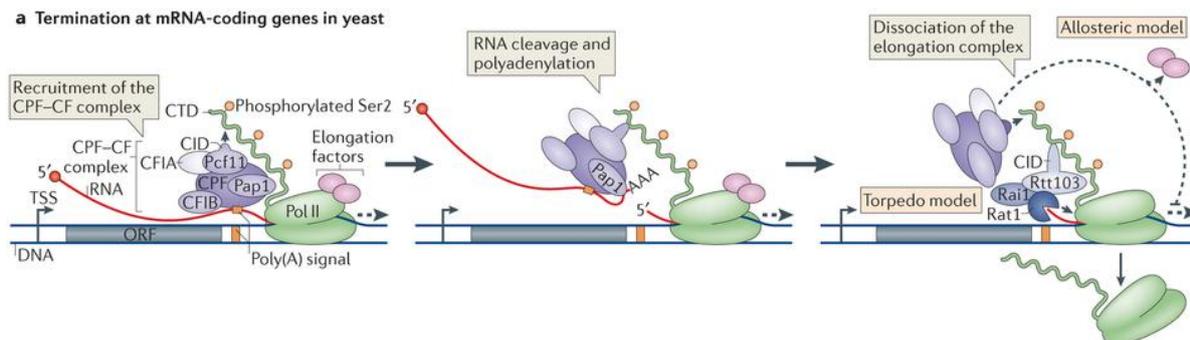


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Termination an mRNA-codierenden Genen in Hefe (Abbildung aus Porrua and Libri, 2015)

1.2.5 Spleißen

Das Hefegenom ist sehr kompakt, weshalb die allermeisten Gene sehr arm an Introns sind. Über das gesamte Hefegenom verteilt gibt es nur 234 Introns (Spingola et al., 1999a) von denen sich 101 innerhalb von Genen für ribosomale Proteine befinden. Da die Transkription dieser Gene jedoch in der logarithmischen Wachstumsphase 50% der gesamten Pol-II-abhängigen Transkription ausmachen (Warner, 1999) ist der Prozess des Spleißens auch in Hefe ein sehr abundanter Prozess. {Auch tRNA wird gespleißt, ca. 21% aller tRNA Gene tragen Introns (Trotta et al., 1997).} Die meisten Gene werden post-transkriptional gespleißt (Tardiff et al., 2006) doch gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass durch eine Verlangsamung der Transkription auch Co-transkriptionales Spleißens möglich wäre (Merkhofer et al., 2014).

Nach der Transkription besteht die mRNA aus nicht codierenden Sequenzen (Introns) und codierenden Exons. Durch den Prozess des Spleißens werden die nicht-codierenden Bereiche aus der mRNA herausgetrennt und die codierenden wieder zusammengefügt. Dabei passiert es natürlich auch, dass Exons entfernt werden, was dann zu einer anderen und in dem Fall kürzen Proteinvariante führt. Durchgeführt wird dieser Prozess durch das Splicosome, ein mehrere megaDalton umfassender RNA-Protein Komplex. Das klassische U2-Splicosome besteht aus 6 nicht-codierenden snRNA's mit der Bezeichnung U1, U2, U3, U4, U5 und U6. Diese sind mit sieben Sm-Proteinen assoziiert (B/B', D1, D2, D3, E, F und G). Im ersten Schritt bindet der U1 snRNP an die 5'-Spleißstelle und der U2 snRNP an die Verzweigungsstelle (siehe Abbildung 12). Durch das Zusammenfügen dieser beiden entsteht das Pre-Splicosome – der sogenannte Komplex A. Im nächsten Schritt werden das U5 snRNP und das U4/U6 snRNP zu Spleißstelle rekrutiert und es bildet sich der Pre-katalytische Komplex B aus. U1 und U4 snRNP dissoziieren nun ab und an der 5'-Spleißstelle wird die Phosphodiesterbindung durch eine Transester Reaktion gespalten. Im Zweiten Schritt erfolgt eine weitere Transester Reaktion ausgehend von der 3'-OH an der 5'-Spleißstelle. Diese hat die Verknüpfung der Exons und eine Freisetzung des Introns in der charakteristischen Lassostruktur (Lariat) zur Folge.

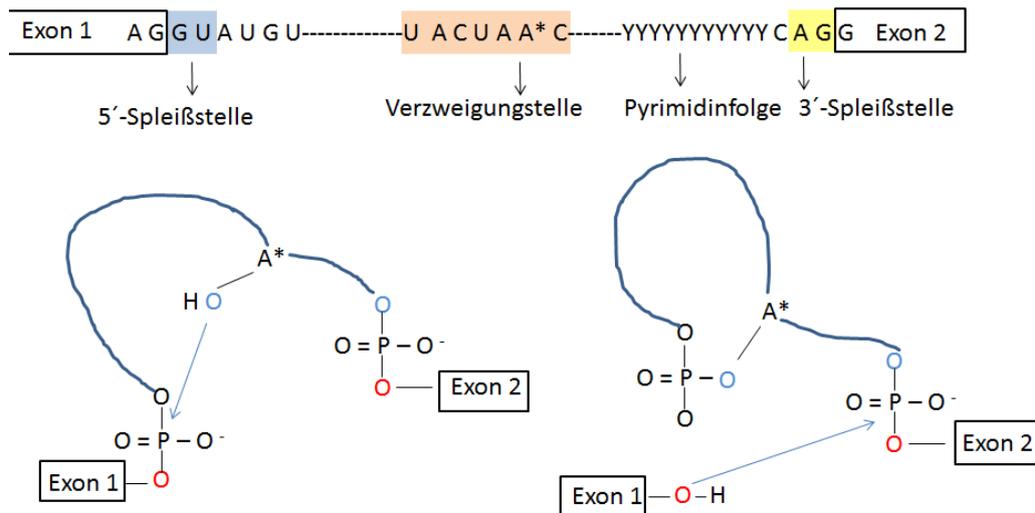


Abbildung 12 Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus des Spleißens von mRNA

1.2.6 Chromatin

Wie in allen eukaryotischen Zellen ist auch in Hefe die DNA als Chromatin organisiert. Diese kompakte und gleichzeitig flexible Verpackung der Erbinformation dient vor allem der Transkriptionsregulation, der Platzeffizienz und dem Schutz vor zellulärem Stress und Umwelteinflüssen. Da besteht im Wesentlichen aus DNA, Histonen und anderen Proteinen. Die Zusammensetzung und Struktur dieses Nucleoproteinkomplex ist je nach Funktionalität des jeweiligen Abschnitts und Zellzustand unterschiedlich und hoch dynamisch.

1.2.6.1 Chromatinstruktur

Die kleinste strukturelle Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Dieses besteht aus je 2 Kopien der 4 Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Luger et al., 1997), zusammen bilden sie demnach ein Oktamer. Die DNA ist mit einer Länge von 147 Basenpaaren eng um das Nukleosom geschlungen. An 14 Stellen kommt es zu einer direkten Interaktion zwischen DNA und Histonen, meistens besteht diese zwischen einem positiv geladenem Lysinrest und einer Phosphatgruppe (Luger et al., 1997). Die Nukleosomen sind auf der DNA wie auf einer Perlenkette aufgereiht. Das Histon H1 – das sogenannten Linker-Histon - bindet an die 10-60bp lange DNA außerhalb des Nukleosoms. Zusammen bilden sie das Chromatosom und falten sich zu einer 30 nm Faser. Diese Faser wird in Schleifen gelegt und durch weitere Nicht-Histon Proteine weiter kondensiert

1.2.6.2 Chromatin Remodeling und Histonmodifikationen

DNA-Abschnitte die mit Nukleosomen bedeckt sind, können nur sehr schlecht von Transkriptionsfaktoren und dem Transkriptionsapparat angesteuert werden (Han et al., 1988), weshalb das Chromatin aufgelockert werden muss. Im Gegensatz dazu sollen stillgelegte DNA-Abschnitte gar nicht für Transkriptionsfaktoren zugänglich sein und deshalb kompakter im Chromatin verpackt. Diese flexible Assoziation der Nukleosomen oder auch Modellierung des Chromatins (*Chromatin Remodelling*) wird über verschiedene Komplexe ausgeführt und reguliert. Man unterscheidet dabei zwischen den ATP-abhängigen Nukleosomen-Remodulierung-Maschinen (Vignali et al., 2000) und Enzymkomplexen, welche die unstrukturierten N-Termini der Histone posttranslational modifizieren (Ng and Bird, 2000). Zu der ersten Kategorie gehören unter anderem die Komplexe Swr1, Swi/Snf, Iswi und der RSC Komplex. Diese aus bis zu 16 Untereinheiten bestehenden Komplexe verändern ATP-abhängig die Position der Nukleosomen auf der DNA um einen Nukleosom-freien Bereich an den Promotorregionen zu schaffen (Bernstein et al., 2004). Die Wechselwirkung zwischen der DNA und den Histonen wird dabei nur übergangsweise aufgehoben. Um die Interaktion dauerhaft zu beeinflussen,

müssen die Histone modifiziert werden, was durch die zweite Kategorie der Chromatin-Remodulierungskomplexe geschieht. Innerhalb dieser Kategorie lassen sich Enzyme zusammenfassen, die durch Modifikationen der N-terminalen Bereiche der Histone, die ionischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenem DNA Phosphatrückgrat und den positiv geladen Aminosäureresten beeinflussen. Diese Modifikationen spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Chromatinstruktur, der epigenetische Regulation und der allgemeinen Transkriptionskontrolle (Kouzarides, 2007). Dabei handelt es sich unter anderem um Methylierungen und Acetylierungen von Arginin- und Lysinresten, Ubiquitinylierung und Sumoylierung von Lysin oder Phosphorylierung von Serin und Threonin. Die Art und Position der Modifikation kann als eine Art Code (Abbildung 13) für die Aktivität des jeweiligen Genbereichs interpretiert werden (Rippe et al., 2007). So sind Histone an aktiv transkribierten Genen an der Promotorregion und auch am 5'-Ende des codierenden Bereiches stark acetyliert (z.B H3K9ac, H3K18). Innerhalb der codierenden Region sind vor allem dreifach Methylierungen (z.B. H3K4me3) zu finden (Kouzarides, 2007; Liu et al., 2005). Durch diese Modifikationen werden ionische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats und den positiv geladenen Lysinresten unterbrochen und die Wechselwirkung zwischen Nucleosom und DNA gelockert. Des Weiteren sind Nucleosomen, welche die TSS flankieren angereichert mit der Histonvariante H2A.Z (Liu et al., 2005). Transkriptional inaktive Genbereiche dagegen sind gekennzeichnet durch eine Hypoacetylierung der Lysinreste. Außerdem finden sich an diesen Bereichen häufig auch ubiquitinylierte und sumoylierte Histone (Kouzarides, 2007). Durch diese zielgerichtete Modulierung der Modifizierungen und des Acetylierungsgrades im Besonderen, wird darüber entschieden ob ein Gen transkribiert wird oder nicht. Eine besonders wichtige Bedeutung haben in diesem Zusammenhang der SAGA Komplex und der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIID. Beide Proteinkomplexe teilen nicht nur viele Untereinheiten, sondern besitzen jeweils eine Untereinheit mit der Funktionalität einer Histonacetylase (SAGA:Gcn5; TFIID: Taf145).

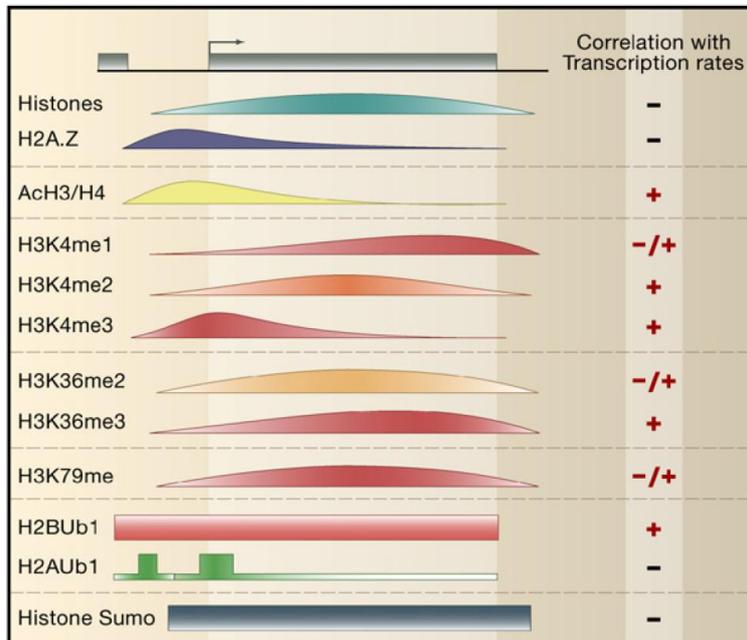


Abbildung 13 Relative Verteilung von Histonvarianten und ausgewählten Histonmodifikationen über ein Gen und deren Korrelation zur Transkriptionsrate. Bildquelle: modifiziert nach (Li et al., 2007). Histone können an 60 verschiedenen Positionen modifiziert werden.

1.2.6.3 Telomere

Im Gegensatz zu den Abschnitten im Genom in denen Transkription stattfindet, zeichnen sich bestimmte Bereiche durch eine enorm dichte Verpackung der DNA aus. Dies trifft auch auf die Enden der linearen Chromosomen zu- die Telomere. Diese Bereiche würden auf Grund der Tatsache, dass während der Replikation keine Primer mehr für die DNA Polymerase gebildet werden können, bei jeder Replikationsrunde um ein Stück kürzer werden. Dieses Problem wird in vielen Organismen dadurch

umgangen, dass nach jeder Replikationsrunde über eine Reverse Transkriptase die Telomerbereiche immer um die gleiche Sequenz verlängert. In *Saccharomyces cerevisiae* bestehen die Telomere aus den Tandemwiederholungen $(TG_{1-3})_n$ (Louis, 1995) und haben typischerweise eine Länge von 300 Nukleotiden. Hinter diesen Sequenzen findet sich der Subtelomerbereich (Abbildung 14), welcher aus den Elementen Y' und X besteht (Louis and Haber, 1990). Die X Elemente finden sich in allen Chromosomen und zeichnen sich durch eine sehr geringe Dichte an Nukleosomen aus. Y'-Elemente befinden sich direkt hinten den Tandemwiederholungen nur einiger weniger Chromosomen und sind von vielen Nukleosomen bedeckt (Zhu and Gustafsson, 2009). Das Protein Rap1 erkennt die TG-Wiederholungen (Longtine et al., 1989) und rekrutiert seinerseits die Proteine Rif1/2 und den Sir Komplex - bestehend aus Sir2, Sir3 und Sir4. Sir2 als NAD-abhängige HDAC deacetyliert vorhandene Nukleosomen (H4K16) (Cubizolles et al., 2006) und sorgt damit dafür, dass Sir3 und Sir4 an die hypoacetylierten N-Termini der Histone binden können (Grunstein, 1997). Diese Rekrutierung setzt sich entlang des Telomers fort und führt dazu, dass die Histone deacetyliert werden und die Transkription der in diesem Bereich liegenden Gene unterdrückt wird (*telomere position effect* (rezensiert in Ottaviani et al., 2008)). Interessanterweise scheint die Histonacetylase Sas2 als Gegenspieler zu Sir2 diesen Effekt in einem Gleichgewicht zu halten (Dang et al., 2009) und sorgt für eine Abgrenzung von Euchromatin und Heterochromatin.

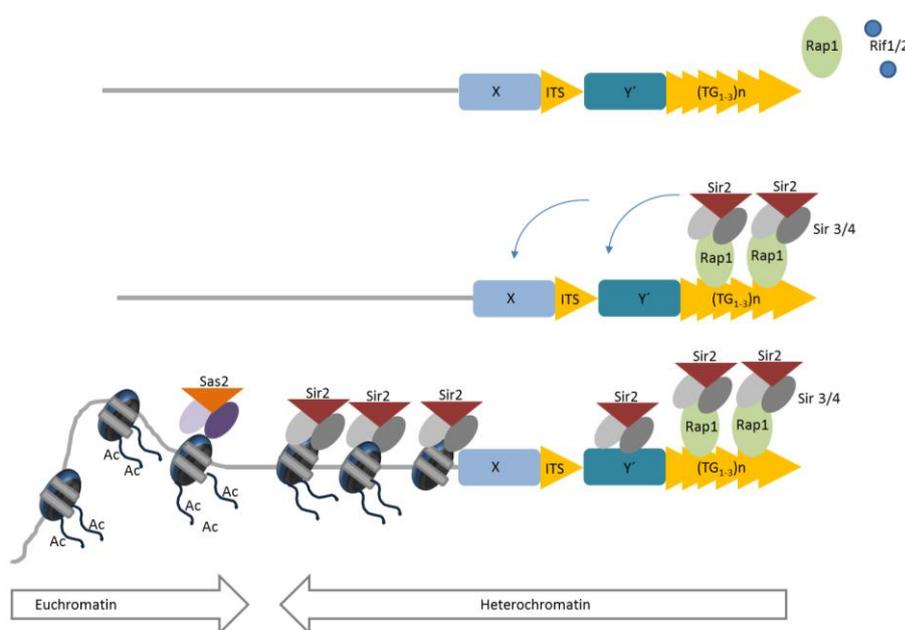


Abbildung 14 Aufbau der Telomere in *Saccharomyces cerevisiae* und Schematische Darstellung des Telomer-Positionseffektes (Abbildung modifiziert nach (Ottaviani et al., 2008)). Der Sir-Komplex wird durch Rap1 an die Telomere rekrutiert. Sir2 deacetyliert alle Nukleosomen entlang des Subtelomerischen Bereichs und verdichtet das Chromatin. Diese Ausbreitung endet an dem Punkt, wo die Histonacetylase Sas2 diesen Vorgang umkehrt und im Gleichgewicht hält.

1.3 Der Mediator Komplex

Die Promotor-abhängige Transkription (beschrieben im Kapitel 1.2.3 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) konnte 1980 aus aufgereinigten Transkriptionsfaktoren zellfrei rekonstruiert werden (Manley et al., 1980). Es gelang jedoch nicht die Transkriptionsrate der Polymerase II durch Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen. Erst 1990 identifizierte man einen Faktor, der die Transkription in vitro unterstützen und regulieren kann (Flanagan et al., 1991; Kelleher et al., 1990). Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Faktor sowohl an der C-terminalen Domäne der Polymerase II bindet (Kim et al., 1994), als auch mit den Transkriptionsfaktoren interagiert. Wie eine Brücke verbindet er beide Komponenten der Transkription und vermittelt (englisch: *mediates*) den Einfluss genspezifischer Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität der RNA-Polymerase II, was zu der Bezeichnung Mediator führte. Auch wenn er für die basale Genexpression nicht notwendig ist, hat er sich doch als eine Plattform erwiesen, die es der Zelle ermöglicht über Transkriptionsregulation auf zelluläre Signale zu reagieren.

1.3.1 Struktur und Aufbau

Der Mediatorkomplex ist strukturell und funktional von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert (Boube et al., 2002; Bourbon, 2008), starke Sequenzhomologien bestehen jedoch nicht. Die Anzahl seiner Untereinheiten reicht je nach Spezies von 20 bis 30 Proteine. In Hefe setzt sich der Kernkomplex aus 21 Untereinheiten zusammen die sich in 3 Module strukturieren lassen Kopf-, Mittel- und Schwanzmodule (Guglielmi et al., 2004; Myers and Kornberg, 2000a). Ein viertes Modul aus 4 weiteren Untereinheiten ist flexibel am Kernmediator assoziiert. Dieses Modul enthält unter anderem die Proteinkinase Cdk8 und das Cyclin C und wird als Kinase- oder Cdk8-Module bezeichnet (Borggreffe et al., 2002). Der gesamte Komplex aus 25 Untereinheiten hat ein Molekulargewicht von über 1 Mega Dalton und wird im folgendem als Cdk8-Mediator bezeichnet.

Viele Untereinheiten beinhalten stark unstrukturierte Bereiche (Tóth-Petróczy et al., 2008), was dem Mediator ein hohes Maß an struktureller Flexibilität ermöglicht. In Verbindung mit der Pol II streckt er sich aus einer kompakteren Form, die er mit dem Kinasemodul einnimmt (Davis et al., 2002). Auch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren beeinflusst seine Konformation (Bernecky et al. 2011). Dabei können verschiedene Transkriptionsfaktoren auch unterschiedliche Änderungen in der Struktur auslösen, was es wiederum ermöglicht, dass andere Cofaktoren binden (Meyer et al., 2010; Taatjes et al., 2004).

1.3.1.1 Kopfmodul

Das Kopfmodul besteht aus den 7 Untereinheiten Med6, Med8, Med11, Med17, Med18, Med20 und Med22 und stellt das innerhalb der Eukaryoten am stärksten strukturell konservierte Modul dar (Bourbon, 2008). Die flexiblen Elemente Med8, Med18 und Med20 sind alle über Med17 mit einander verbunden (Larivière et al., 2012). und bilden zusammen eine Art Kiefer –ähnlicher Struktur (Cai et al., 2010). Das Kopfmodul interagiert über die Untereinheit Med8 mit dem TATA-Box Bindeprotein (Larivière et al., 2012) und mehreren Untereinheiten der Polymerase II (Rpb3, Rpb4 und Rpb7 (Cai et al., 2010)). Vor allem die Interaktion zwischen Med17 und Rpb3 ist essentiell für die genomweite Rekrutierung der Pol II in vivo (Soutourina et al., 2011). Die Untereinheit Med17: dient als strukturelle Plattform und verknüpft das Kopfmodul mit der Gerüst-Untereinheit Med14, die sich durch den gesamten Komplex zieht. Wird Med17 durch Genmutationen verkürzt werden 93% der Klasse-II-Gene um mehr als die Hälfte herunter reguliert (Holstege et al., 1998).

1.3.1.2 Mittelmodul

Das Mittelmodul ist das am stärksten evolutionär konservierte Modul und besteht aus 8 Untereinheiten. Auch hier gibt es Interaktionen mit der Polymerase II aber auch mit dem Kinasemodul über die Untereinheiten Med1 und Med4 (Kang et al., 2001).

Interessanterweise führt eine Deletion der Untereinheit Med19 zu einem kompletten Verlust dieses Modules, worauf sich zwar ein stabiler Komplex aus Kopf und Schwanzmodule bildet, die Funktion als Co-Regulator aber verloren geht (Baidoobonso et al., 2007).

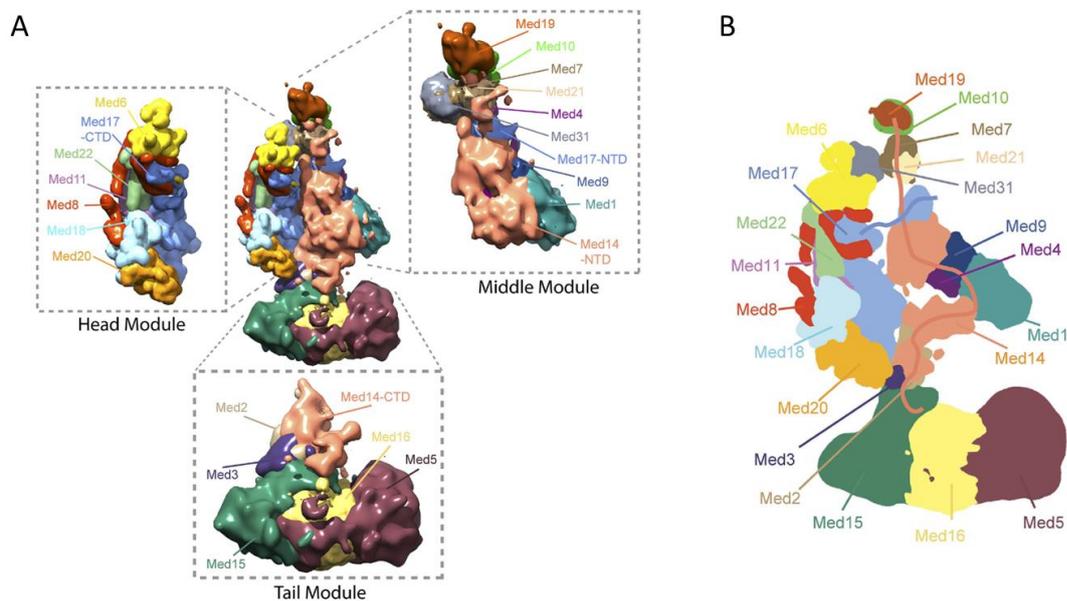


Abbildung 15 Architektur des Mediator-Komplexes ohne Kinase-Modul (Robinson et al., 2015). Lokalisierung der einzelnen Untereinheiten als Elektronendichtekarte (A) und als schematische Darstellung (B)

1.3.1.3 Schwanzmodul

Die meisten Transkriptionsaktivatoren interagieren mit dem Schwanz-Modul. Dieses zeichnet sich durch besonders viele Aktivatorbindedomänen aus (Jedidi et al., 2010), welche wiederum mit den Transaktivierungsdomänen der Aktivatoren interagieren. Des Weiteren finden sich in diesem Modul besonders viele unstrukturierte Bereiche (Tóth-Petróczy et al., 2008), und es zeigt die größte strukturelle Dynamik bei Proteininteraktionen (Meyer et al., 2010). Wie in Abbildung 15 zu sehen durchspannt Med14 fast den gesamten Komplex, verknüpft alle 3 Module miteinander und bildet dabei eine Art Rückgrat (Cevher et al., 2014). Ohne diese Untereinheit zerfällt der Mediator-Komplex regelrecht, wobei ein Modul aus den Untereinheiten Med2, 3 und 15 erhalten bleibt. Diese Triade wird auch als Gal11-Modul bezeichnet und bindet anscheinend transients an den Kernkomplex als andere Untereinheiten (Lewis and Reinberg, 2003). Es kann sogar unabhängig vom Kernmediator an die Promotorregion rekrutiert werden und zu einer Aktivierung der Transkription führen (Anandhakumar et al., 2016; Zhang et al., 2004). Die Untereinheit Med5 hat die katalytische Aktivität einer Acetyltransferase (Lorch et al., 2000), und ist somit das einzige Enzym innerhalb der Mediator-Komplexes neben der Kinase im Cdk8-Modul. Diese Funktion findet sich in höheren Eukaryoten nicht. Eine Deletion führt zu einer erhöhten Expression kernkodierter mitochondrialer Proteine und gleichzeitig zu einer Herunterregulierung mitochondrialer Gene (Béve et al., 2005).

Tabelle 2 Auflistung aller Mediator-Module, der dazu gehörigen Untereinheiten, deren Molekulargewicht und ausgewählter Interaktionspartner oder Enzymsubstrate (modifiziert nach (Poss et al., 2013))

Modul	Untereinheit	MW	Interaktionspartner	Referenz
Kopf	Med6	32.8 kDa	Rpb1	(Robinson et al., 2012)
	Med8	25.3 kDa	TBP Rpb1	(Larivière et al., 2006) (Robinson et al., 2012)
	Med11	15.1 kDa	Rad3	(Esnault et al., 2008)

	Med17 / Srb4	78.5 kDa	Gal4 Rpb3 Rpb1, Rpb4 H4 Rad2/XPG	(Koh et al., 1998) (Soutourina et al., 2011) (Plaschka et al., 2015) (Liu and Myers, 2012) (Eyboulet et al., 2013)
	Med18 / Srb5	34.3 kDa	TFIIS	(Malagon et al., 2004)
	Med20 / Srb2	22.9 kDa	Rpb2, Rpb3	(Plaschka et al., 2015)
	Med22 / Srb6	13.9 kDa	Gcn4	(Zhang et al., 2004)
Mitte	Med1	64.3 kDa	Cdk8-CycC	(Boube et al., 2002)
	Med4	32.2 kDa	Rpb1	(Plaschka et al., 2015)
	Med7	25.6 kDa		
	Med9	17.4 kDa	Rpb1	(Plaschka et al., 2015)
	Med10 / Nut2	17.9 kDa	Tfg1	(Plaschka et al., 2015)
	Med19 / Rox3	24.9 kDa	Rpb1	(Plaschka et al., 2015)
	Med21 / Srb7	16.1 kDa	Tup1	(Gromöller and Lehming, 2000)
	Med31 / Soh1	14.7 kDa	TFIIS	(Malagon et al., 2004)
Schwanz	Med2	47.7 kDa	Gcn4	(Zhang et al., 2004)
	Med3 / Pgd1	43.1 kDa	Gcn4	(Zhang et al., 2004)
	Med5 / Nut1	128.8 kDa	H4	(Liu and Myers, 2012)
	Med14 / Rgr1	123.4 kDa	Rpb1, Rpb4, Tfg1	(Plaschka et al., 2015)
	Med15 / Gal11	120.3 kDa	Oaf1, Pdr1, Pdr3 VP16, Gal4, Gcn4 Hsf1 TFIIE	(Thakur et al., 2009) (Park et al., 2001) (Kim and Gross, 2013) (Sakurai et al., 1996)
	Med16 / Sin4	111.3 kDa	Gcn4 TFIIS	(Zhang et al., 2004) (Malagon et al., 2004)
Cdk8-Modul	Med12/Srb8/SSN5	166.8 kDa	TBP	(Plaschka et al., 2015)
	Med13/Srb9/SSN2	160 kDa		
	Cdk8 / Srb10 / SSN3	62.8 kDa	Substrate GCN4, MSN2 Ste12 Phd1 Tup1 TFIID Rpb1 Med3 Med2	(Chi et al., 2001) (Nelson et al., 2003) (Raithatha et al., 2012) (Schüller and Lehming, 2003) Liu et al., 2004 (Hengartner et al., 1998) (Gonzalez et al., 2014)

			Gal4	(Hallberg et al., 2004) (Hirst et al., 1999)
	CycC/ Srb11 / SSN8	1.8 kDa		

1.3.1.4 Das Cdk8-Module

Das Cdk8-Modul unterscheidet sich grundlegend vom Kernmediator, da es nur transient am selbigen assoziiert ist. Es besteht aus den Untereinheiten Med12 und Med13, die für die Interaktion mit dem Kernmediator verantwortlich sind (Tsai et al., 2013), dem Cyclin C und der namesgebenden Proteinkinase Cdk8. Die Assoziation mit dem Kernmediator erfolgt über die Untereinheiten des Kopf und Mittelmodules (siehe Abbildung 16) und ist in Hefe weitestgehend mit einer Repression der Genregulation verbunden. Diese kann auf verschiedenen Ebenen beobachtet werden: Zum einen führt die Assoziation zu einer intrinsischen strukturellen Veränderung des gesamten Komplexes (Tsai et al., 2013). In *Saccharomyces Pombe* konnte zudem eindeutig gezeigt werden, dass dieses Modul die RNA-Polymerase II sterisch an einer Bindung hindert (Elmlund et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung des Serin-5 an der C-terminalen Domäne der Pol II und der Untereinheit Med2 durch Cdk8 eine Assemblierung verhindert (Hallberg et al., 2004; Hengartner et al., 1998). Ein weiteres Substrat der Cdk8-Kinase ist das Cyclin H des Transkriptionsfaktors TFIIH. Diese Phosphorylierung hemmt dessen Kinaseaktivität und damit Initiation der Transkription (Akoulitchev et al., 2000). Die Phosphorylierungen der Cdk8 können zudem ein Signal zum Proteinabbau sein. So werden phosphorylierte Transkriptionsfaktoren (Chi et al., 2001) und auch Untereinheiten des Schwanzmodules (Gonzalez et al., 2014) von Ubiquitin-Ligasen erkannt und durch die Übertragung von Ubiquitin für den weiteren Proteinabbau markiert.

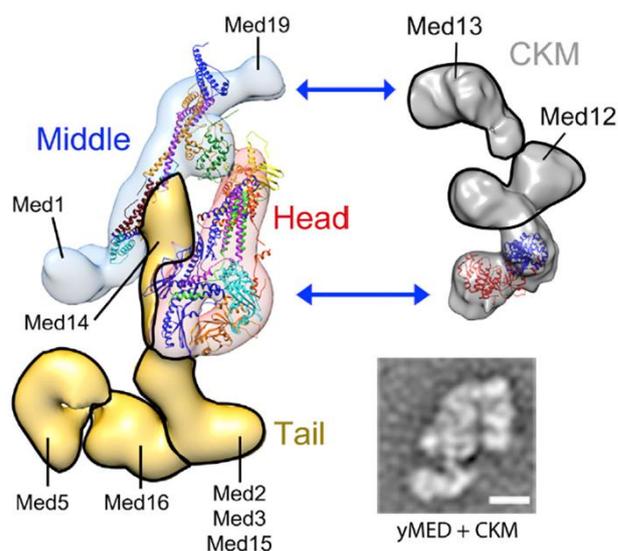


Abbildung 16 Position und relative Anordnung aller 25 Untereinheiten des Mediator Komplexes (Abbildung aus (Tsai et al., 2014)). Verfügbare Röntgen-kristallstrukturen sind in die Struktur aufgeklärt mittels Kryo-EM eingefügt. Ein Originalbild aus der Kryo-EM-Messung eines Mediator-komplex-Partikels mit Kinase-moduls ist unten rechts abgebildet.

1.3.1.5 Posttranslationale Modifikationen

Die vielen Funktionen und strukturellen Veränderungen, lassen vermuten, dass der Mediator durch posttranskriptionale Modifikationen reguliert wird. Die ihm zugeschriebene Rolle als zentrale Regulationsplattform induziert geradezu die Möglichkeit, auch als Endpunkt verschiedener Signalwege zu fungieren. So mündet beispielsweise der Ras/PKA Signalweg in der zweifachen Phosphorylierung von Med13 im Kinasemodul (Chang et al., 2004). Wie jedoch die Signale genau mit der Transkriptionsrate der Polymerase II korrelieren und wie sie in den Regulationsprozess integriert werden ist weitgehend unbekannt. Weiterhin ist der Mediatorkomplex an mindestens 125 Stellen verteilt über 17 Untereinheiten mehrfach phosphoryliert (Miller et al., 2012), von denen sich allein 45 auf Serin- und Threoninreste der Untereinheiten Med5 und Med15 verteilen. Die Position dieser Modifikationen fokussiert sich an Proteindomänen, von denen bekannt ist, dass sie an der Interaktion mit Transkriptionsregulatoren beteiligt sind (Jedidi et al., 2010). Weiterhin beobachteten Miller et al., dass sich dieses Modifikationsmuster unter Salzstress verändert. Welche Proteinkinasen für die Phosphorylierungen im Einzelnen verantwortlich sind, ist weitestgehend unklar. Bekannt ist beispielsweise, dass die Cdk8 Kinase Med2 am Serin 208 phosphoryliert. Diese Modifikation ist essentiell für die Transkription der Gene auf dem 2µm Plasmid (Hallberg et al., 2004). Kin28, die Kinase des Transkriptionsfaktors TFIIH, phosphoryliert Med14 (Liu et al., 2004) (Liu et al., 2004) und Med4 (Guidi et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass die Untereinheit Med5 SUMOyliert ist (Wykoff and O'Shea, 2005). SUMO (*Small Ubiquitinrelated MODifier*) ist eine Ubiquitin-ähnliche Proteinmodifizierung, welche in verschiedene zelluläre Abläufe involviert ist. Welche Rolle sie im Zusammenhang mit dem Mediator spielt, ist unbekannt.

1.3.2 Funktionen des Mediatorkomplexes in der Transkription der mRNA

Der Mediatorkomplex ist an der Regulation der meisten von Pol II transkribierten Gene beteiligt (Holstege et al., 1998). Sein Einfluss auf die Genaktivität kann dabei aktivierend und auch repressiv sein. Aufgrund der Tatsache, dass die Transkription an sich ein sehr heterogener Prozess ist und je nach Gen sehr unterschiedlich reguliert sein kann, ist auch die Rolle und Bedeutung des Mediatorkomplexes am Prozess der Transkription sehr verschieden. Genomweite Expressionsanalysen zeigen z.B., dass die Deletion einzelner nicht essentieller Untereinheiten die Expression verschiedener Gengruppen beeinflussen (van de Peppel et al., 2005). Des Weiteren bindet der Mediatorkomplex interessanterweise nicht oder nur sehr schwach an die Promotorregionen von ribosomalen Proteingenen (Paul et al., 2015) und konnte auch nicht über ChIP-Experimenten an den glykolytischen Genen CDC19 und ENO2 detektiert werden (Fan et al., 2006), obwohl die Transkription dieser Gene ca. 50% der gesamten Transkription in Hefe ausmachen (Warner, 1999).

1.3.2.1 Initiation und Repression

Der Mediatorkomplex selber hat keine DNA-Bindeaffinität, er interagiert aber wie schon im Abschnitt 1.3.1.3 beschrieben über die Untereinheiten des Schwanzmodul mit Transkriptionsaktivatoren, die über ihre DNA-Bindedomäne an die jeweiligen Enhancerelemente binden. Diese Rekrutierung ist jedoch nicht bei allen Genen vom Schwanzmodul abhängig. So werden SAGA-regulierte Gene (z.B. PMA1) viel stärker von einer Deletion der Untereinheiten Med2, 3, 15 beeinflusst als TFIID-regulierte Gene. Das Fehlen dieser Untereinheiten hat beispielsweise auf die Rekrutierung des Mediators an das TFIID-regulierte Cha1-Gens keinen Einfluss (Ansari et al., 2012). Daraus ergeben sich mindestens 2 unterschiedliche Möglichkeiten, wie die Assemblierung des Pre-Initiationskomplexes über den Mediatorkomplex koordiniert werden kann (Abbildung 17). Es ist zudem durchaus vorstellbar, dass der Mediator in beiden Fällen eine ganz unterschiedliche Konformation aufweist (Ansari and Morse, 2013).

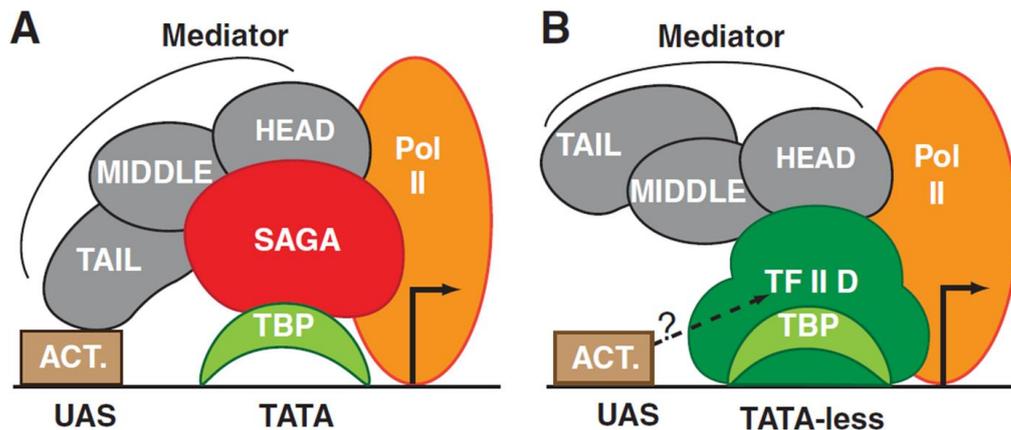


Abbildung 17 Schematische Darstellung der zwei Möglichkeiten, wie der Mediator-Komplex an der Pre-Initiation beteiligt ist. (Abbildung aus Ansari et al., 2012) A.) SAGA abhängige Gene sind meist induzierbar, weisen in den meisten Fällen eine TATA-Box in ihrer Promotorstruktur auf. Und machen ca. 15% aller Gene aus. Über die Untereinheiten des Schwanzmoduls kommt es zur Interaktion mit den Aktivator und der Mediator wird zum Promotor rekrutiert. B.) TFIIID-regulierte Gene sind meist konstitutiv aktiv und besitzen keine TATA-Box. Die Untereinheiten des Schwanzmoduls sind für eine Rekrutierung nicht erforderlich, sie erfolgt maßgeblich über das Kopf- und Mittelmodul.

Diese Rekrutierung erfolgt interessanterweise immer mit dem Kinase-Modul (Abbildung 18). So konnte in verschiedenen Publikationen gezeigt werden, dass am aktiven wie inaktiven Promotor der gesamte Mediator-Komplex aus allen 4 Modulen assoziiert ist (Andrau et al., 2006; Jeronimo and Robert, 2014; Petrenko et al., 2016). Die Interaktion zwischen Promotor und Mediator scheint demnach nicht per se mit einer gesteigerten Transkription zu korrelieren. Erst nach der Rekrutierung wird über den Einfluss des Mediators auf die Transkription entschieden (Andrau et al., 2006). Im Falle einer Gen-Repression wird der Mediator-Komplex inklusive Cdk8-Modul am Promotor verbleiben. Dies betrifft vor allem Gene, die schnell aktiviert werden müssen, wenn Umweltveränderungen eintreten (Andrau et al., 2006). Neben der sterischen Inhibition der Polymerase II, ist auch die Kinaseaktivität des Cdk8-Moduls für die Repression verantwortlich (Abschnitt 0). Diese Funktion scheint für die Genrepression essentiell zu sein. Holstege et al. konnten zeigen, dass eine Inaktivierung der Cdk8-Kinase zu einem Anstieg der Transkriptionsrate bei mehr als 170 Genen führte (Holstege et al., 1998). Im Falle einer Genaktivierung werden die allgemeinen Transkriptionsfaktoren zum Promotor rekrutiert. Dabei interagiert der Mediator-Komplex direkt mit Untereinheiten des TFII, TFIIH und dem TATA-Box-Bindeprotein und stabilisiert den PIC. Mit der Rekrutierung der Polymerase II und der GTF's TFIIIB und TFIIIE ist der Pre-Initiationskomplex komplett. Die Interaktion zwischen Mediator und Polymerase II erfolgt weitestgehend über die C-terminale Domäne. Durch die Kinase Kin28 des TFIIH wird diese Domäne am Serin 5 phosphoryliert, die Interaktion zwischen Mediator und Pol II löst sich (Søgaard and Svejstrup, 2007) und die Polymerase II verlässt den Promotor (*promotor clearance*) (Akoulitchev et al., 1995). Obwohl mehrere Kinasen an der Phosphorylierung der CTD während der Initiation beteiligt sind, ist die Dissoziation des PIC nur von der Aktivität der Kin28 abhängig (Jeronimo and Robert, 2014). Mit der Dissoziation der Polymerase II und den Transkriptionsfaktoren TFIIIB und TFIIIE vom Transkriptionsstart, verbleibt der Mediator als eine Art Gerüst oder Plattform am Promotor (Yudkovsky et al., 2000). Die dauerhafte Lokalisation des Mediators am Promotor ermöglicht es der die Transkription konstitutiv aktiver Gene schnell wieder zu re-initiiieren. Da er auch bei inaktiven Genen am Promotor assoziiert bleibt, könnte er außerdem eine Signalplattform darstellen, die es der Zelle bei Umweltveränderungen ermöglicht Stress-Gene schnell zu transkribieren.

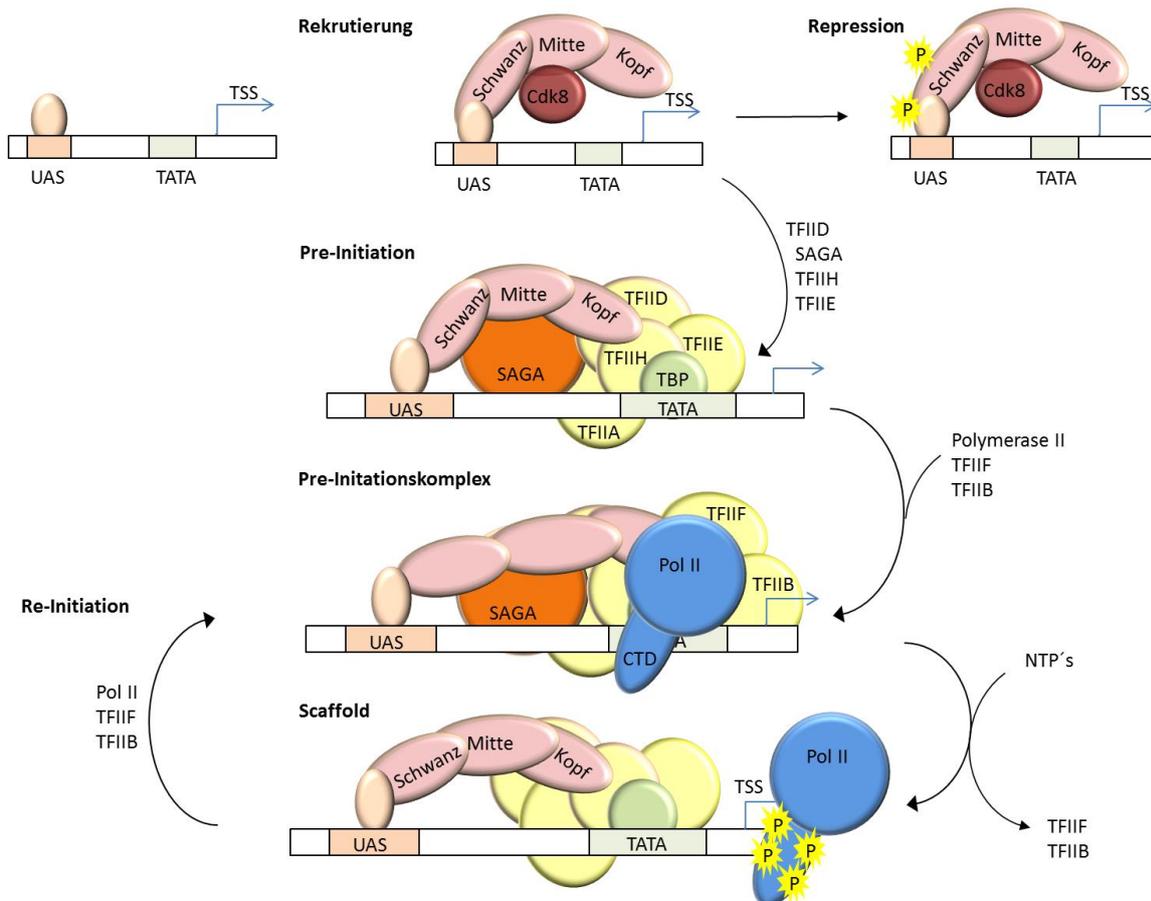


Abbildung 18 Schematische Darstellung der Rekrutierung des Mediator-Komplexes an den Promotor. Der Mediator wird mit dem Cdk8-Modul rekrutiert. Im Falle einer Repression der Transkription verbleibt das Kinasemodul am Mediator. Cdk8 phosphoryliert die CTD der Pol II, Untereinheiten des Kernkomplexes und Transkriptionsaktivatoren. Die Assemblierung des Pre-Initiationskomplexes bei einer Aktivierung der Transkription führt zu einer intrinsischen strukturellen Veränderung des Kernkomplexes. Der Mediator interagiert innerhalb des PICs mit Untereinheiten der GTF's und der Polymerase II selbst. Die Interaktion mit der Polymerase II wird durch die TFIIH-abhängige Phosphorylierung der CTD unterbrochen und die Polymerase verlässt den Promotor. Der Mediator verbleibt mit dem Aktivator und einigen GTF's am Promotor. (Abbildung modifiziert nach Yudkovsky et al., 2000)

1.3.2.2 Elongation

Neben der Rolle des Mediator-Komplexes während der Transkriptionsinitiation, verdichteten sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf, dass der Mediator auch nach der Initiation am Prozess der Transkription beteiligt ist und nicht nur in Form einer simplen Ladeplattform am Promotor verbleibt. Eine Beteiligung an der Elongation würde demnach bedeuten, dass er im gesamten Genkörper zu finden sein müsste. Es gibt viele Publikationen, in denen in menschlichen Zellen sowie auch in Hefe eine Co-lokalisierung der Polymerase II und dem Mediator innerhalb Gen-codierender Bereiche beobachtet wurde (Andrau et al., 2006; Donner et al., 2010; Paul et al., 2015; Zhu et al., 2006). Publikationen, die diese Ergebnisse als Artefakte der Methode ChIP deklarieren, gibt es jedoch ebenso (Fan and Struhl, 2009; Jeronimo and Robert, 2014). Nichts desto trotz wurde im menschlichen Zellen schon gezeigt, dass der Mediator-Komplex sogar an mehreren Teilprozessen der Elongation beteiligt ist (Conaway and Conaway, 2013):

- Rekrutierung von Elongationsfaktoren und mRNA-prozessierenden Proteinen wie dem Superelongationskomplex SEC durch Med26 (Takahashi et al., 2011)

- Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II und damit positive Regulierung der Elongation durch Cdk8 (Donner et al., 2010)
- Reaktivierung der pausierenden Pol II nach Transkriptionsstart durch Med23(Wang et al., 2005)

In der Bäckerhefe konnte eine Stimulation der Elongation durch den Mediator anhand seiner Fähigkeit, die Transkription durch die +1 Nukleosomen zu ermöglichen gezeigt werden. So zeigen genetische Analysen, dass Untereinheiten des Mediators mit der Histonmethyltransferase Set2 interagieren (Dettmann et al., 2010) welche für die Methylierungen am Histone 3 (K36) innerhalb codierender Regionen verantwortlich ist (Krogan et al., 2003). Mutationen in Med7, Med14, Med19 und Med21 zeigten bei Hitzestress am HSP82 Gen zeigten keinen Phänotyp bezüglich der Pol II Rekrutierung, eine Transkription über das +1-Nukleosom hinaus konnte jedoch nicht beobachtet werden (Kremer et al., 2012). Weitere Studien konnten zeigen, dass der Mediator mit dem Elongationsfaktor TFIIIS interagiert (Malagon et al., 2004), wobei nicht ganz klar ist, ob diese Interaktion während der Pre-Initiation (Kim et al., 2007) oder wirklich während der Elongation (Guglielmi et al., 2007) eine Rolle spielt.

Der Mediatorkomplex scheint außerdem am mRNA Export beteiligt zu sein. Schneider et al. konnten zeigen, dass es in *Saccharomyces cerevisiae* eine physikalische Interaktion zwischen dem TREX-2 Komplex und der kleinsten Untereinheit Med31 gibt (Schneider et al., 2015). Der TREX-2 Komplex bindet an den Kernporenkomplex der außen und innen wie ein Ring mit speichenartigen Fortsätzen aufgebaut ist. Er beeinflusst die Transkription und auch den mRNA Export vor allem von Genen, die eine räumliche Nähe zur Kernpore besitzen (Gallardo et al., 2003).

1.3.2.3 Termination und Reinitierung

Der Mediatorkomplex scheint auch bei der Termination der Transkription eine essentielle Rolle zu spielen. ChIP-Analysen zeigen, dass der Mediatorkomplex auch mit den 3'-Regionen vieler Gene interagiert (Andrau et al., 2006; Jeronimo and Robert, 2014). Des Weiteren zeigen viele Komponenten des Terminationsapparates wie Ssu72, Rtt103 und Yra1 zumindest eine genetische Interaktion mit mehreren Untereinheiten des Mediatorkomplexes (Collins et al., 2007; Costanzo et al., 2010). Speziell für die Gene CHA1 und INO1 konnte gezeigt werden, dass die Untereinheit Srb5 sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende zu finden ist (Mukundan and Ansari, 2011). Eine Deletion von Srb5/Med18 führte an diesen Genen dazu, dass die Terminationskomplexe CF1 und CPF (Abschnitt 1.2.4) nicht mehr an das 3'-Ende rekrutiert werden und die Polymerase II an den 3'-Enden das Terminationssignal überliest und nicht mehr vom Template ab dissoziiert. Zwei Jahre später konnte dasselbe Labor zeigen, dass die Interaktion von Srb5/Med18 mit dem 3'-Ende von einer DNA-Loop-Struktur abhängig ist ((Mukundan and Ansari, 2013) und Abbildung 19). In dieser Art Schleife werden Promotor und Terminationssequenzen eines Gens über Proteine miteinander verknüpft (O'Sullivan et al., 2004). Wird diese Ausbildung durch eine Mutation des Transkriptionsfaktors TFIIB unterbunden, gibt es auch keine Interaktion mehr von Srb5 mit dem 3'-Ende. Auch eine Deletion von Srb5 verhindert eine Ausbildung dieser Loopstruktur an diesen Genen. Das Verknüpfen der beiden Enden und die Ausbildung des Loops könnten auch bei der Re-Initierung der Polymerase II bei besonders aktiven Genen eine Rolle spielen, ähnlich wie die Loopstruktur der mRNA bei der Translation (Carlsten, 2014).

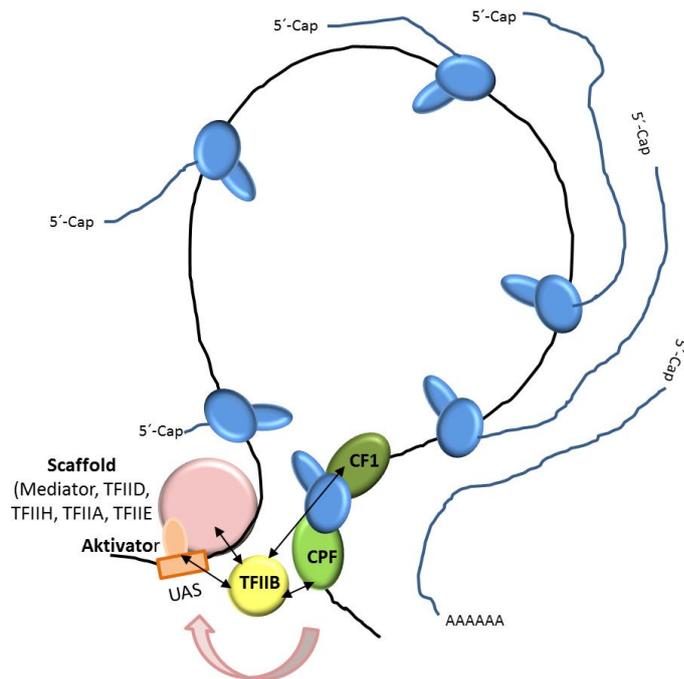


Abbildung 19 Schematische Darstellung der Re-Initiierung der Transkription abhängig von Genschlaufen (Loops). Die Ausbildung einer Genschlaufe ist abhängig von TFIIB. Während aktiver Transkription interagiert der Promotor-gebundene TFIIB sowohl mit dem Aktivatorkomplex als auch mit den Terminator-gebundenen Komplexen CF1 und CPF. (Abbildung modifiziert nach archive.clas.wayne.edu/ansari)

1.3.3 Der Mediator-Komplex und das Chromatin

Die Komposition und Organisation des Chromatins ist von größter Wichtigkeit für den geregelten Ablauf der Transkription und die gesamte Stabilität des Genoms. Der Mediator-Komplex scheint auch hier an vielen Prozessen beteiligt zu sein. Interaktionen zwischen dem Mediator und Nukleosomen sind schon länger bekannt (Lorch et al., 2000). Da der Mediator sogar selbst eine Histonacetylase-Aktivität (Lorch et al., 2000) besitzt und auch mit dem N-Terminus des Histon 4 interagiert (Liu and Myers, 2012), ist nicht auszuschließen, dass er aktiv am *Chromatin Remodeling* beteiligt ist. Beobachtungen zeigen, dass die Interaktion zwischen Mediator und dem Histon 4 durch Acetylierung des N-Terminus verringert wird (Zhu et al., 2011a). Zudem scheint bei manchen Genen die Rekrutierung des Swi/Snf-Komplexes von einem intakten Mediator abhängig zu sein (Lemieux and Gaudreau, 2004). Eine aktuelle Publikation von Chereji et al. konnte zeigen, dass der Mediator-Komplex eine signifikante Rolle in der Genomorganisation spielt (Chereji et al., 2017). Die Daten dieser Studie zeigen, dass er sowohl eine hohe Affinität an die „CID boundaries“ der Chromosomen hat, als auch eine Affinität zu Proteinen, die an der Loopbildung beteiligt sind. Seine Fähigkeit als Architekturgebendes Protein konnte zudem nachgewiesen werden, indem durch das Ausknocken von Med1 die gesamte Chromosomenstruktur verändert wird (Hsieh et al., 2015).

Genomweite Array-Studien haben außerdem gezeigt, dass der Mediator auch an den Telomeren lokalisiert ist (Andrau et al., 2006; Zhu et al., 2011b). Weitere Experimente zeigen, dass er auch an der Integrität der Telomere beteiligt ist. So führt eine Deletion von Untereinheiten des Kopf- und Schwanzmoduls zu einer Verkürzung der Telomere (Askree et al., 2004), das Fehlen des Kinasemoduls jedoch zu einer Verlängerung (Peng and Zhou, 2012): Das Mittelmodul hat eine wichtige Bedeutung in der Stabilität der Telomere. Fehlen Untereinheiten dieses Moduls, wird die Acetylierung an den Telomeren gesteigert (Peng and Zhou, 2012). Dies mag daran liegen, dass durch diese Mutationen das Gleichgewicht zwischen der Acetylase Sas2 und der Deacetylase Sir2 gestört wird (Abschnitt 1.2.6.3) und durch Hyperacetylierung die replikative Lebensdauer verringert wird (Zhu et al., 2011b).

1.3.4 Der Mediator-komplex und DNA-Reparatur

Die vielfältigen Mechanismen der DNA-Reparatur ermöglichen es jeder Zelle die meisten entstandenen Schäden im Erbgut zu neutralisieren, bevor es zu ernsthaften Schäden oder zellulärem Stress in Form von hyper-oder dysfunktionalen Proteinen kommt. Diese Mechanismen können auch während der Transkription (*Transcription coupled DNA repair* - rezensiert in (Hanawalt and Spivak, 2008)) einspringen und fehlerhafte Basenpaarungen entfernen (Nucleotid excision repair - rezensiert in (Prakash and Prakash, 2000)). Vielen Transkriptionsfaktoren wie z.B dem TFIID oder dem Ccr4-Not-Komplex kommen dabei eine duale Rolle zu, neben der Transkription sind sie auch für eine erfolgreiche Transkriptions-gekoppelte DNA-Reparatur verantwortlich (Compe and Egly, 2012; Gaillard et al., 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass auch der Mediator-komplex eine solche duale Rolle spielt. So reagieren Hefestämme ohne die Untereinheiten Med2 und Med15 viel sensitiver auf UV-Strahlung (Gaillard et al., 2009). In einem Yeast-to-Hybrid Experiment konnte zudem eine Interaktion zwischen Med17 und Rad2 nachgewiesen werden (Eyboulet et al., 2013).

Zielsetzung der Arbeit

2 Der Mediator ist ein Proteinkomplex, der als essentieller Co-Faktor für die eukaryotische Transkriptionsregulation aller Protein-kodierender Gene und vieler nichtkodierender benötigt wird. Nach dem bisherigen Erkenntnisstand sind seine 25 Untereinheiten in 4 Module organisiert: Kopf, Schwanz, Mitte und das transient assoziierte Kinase modul. Die 3 Kernmodule bilden dabei einen flexiblen Komplex, der einen essentiellen Bestandteil des Pre-Initiationskomplexes darstellt. Es verdichten sich jedoch die Hinweise darauf, dass er über die Initiation hinaus auch an anderen Prozessen der Transkription beteiligt ist. Zu den vielen ihm neu zugeschriebenen Funktionen, tauchten gleichzeitig immer neue Fragen auf.: Hat der Mediator innerhalb all dieser Funktionen immer dieselbe Zusammensetzung? Fehlen unter Umständen Untereinheiten? Welche Rolle spielen posttranslationale Modifikationen innerhalb der verschiedenen Funktionen? Welche Dynamik haben all diese verschiedenen Interaktionspartner? Das Ziel dieser Arbeit ist somit die umfassende Analyse des Mediatorkomplexes in Hinblick auf seine Zusammensetzung, seiner Interaktionspartner und seiner posttranslationalen Modifikationen. In diesem Zusammenhang sollte ein Protokoll etabliert werden, welches es ermöglicht, den Mediator in all seinen Facetten zu isolieren und mittels Massenspektrometrie zu charakterisieren. Für den ersten Teil der Arbeit bestand das Hauptziel darin, den Mediator unter physiologischen Bedingungen intakt zu isolieren und möglichst viele Interaktionen zu erhalten. Die Analyse der mittels Massenspektrometrie identifizierten Interaktionspartner sollen ein ausführliches Bild darüber geben, in welche Prozesse der Mediatorkomplex involviert sein könnte. Im zweiten Teil der Arbeit sollten Methoden und Ansätze etabliert werden, das analysierte Interaktom in seiner Dynamik und Funktionalität besser zu beschreiben und zu differenzieren.

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Puffer

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
3 SORB	20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 M Sorbitol
PEG 3500 w/v	50g/100ml Polyethylenglycol
1 M Lithiumacetat	6.5g/100ml ddH ₂ O
YPD	20g/l Peptone 10g/l Hefeextrakt 20g/l Glucose
SD-Medium	1g/l Ammoniumsulfat 1.7g Yeast Nitrogen Base - without ammonium sulfate and aminoacids (AMRESCO-VWR) 20g/l Glucose
DNA Lysepuffer (Löoke et al., 2011)	200 mM Lithiumacetat 1% SDS
YPD-Agarplatten	65g/l YPD AGAR (SERVA)
Tris-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl 10% Glycerol 1mM DTT 2mM PMSF 1x complete Protease.Inhibitor (Roche)
300 mM KOAc-Lysepuffer (Rani et al., 2004)	20 mM Hepes (pH 7.5) 300 mM KOAc 10% Glycerol 1mM DTT 2mM PMSF 1x complete Protease.Inhibitor (Roche)
ABC-Puffer	100mM Ammoniumbicarbonat
Entfärbepuffer	70mM Ammoniumbicarbonat, 30% Acetonitril
Transferpuffer	25mM Tris, 192mM Glycine pH 8, 10% Methanol,
MOPS-Laufpuffer	50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7
TAE-Laufpuffer (1x)	40mM Tris (pH 7.5), 20mM Eisessig, 1mM EDTA

3.1.2 Verwendete Plasmide

Vektor	Verwendungszweck	Quelle
p3FLAG KMx	C-terminales 3x FLAG Tagging	(Liu et al., 2001)
pYM16	C-terminales 6x HA Tagging	AG Buchberger (Janke et al., 2004)

3.1.3 Erzeugte und verwendete Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>		
Wt (S288c)	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10	LGC standards
Med17-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med17-HA ₆	Diese Arbeit
Med2-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med2-HA ₆	Diese Arbeit
Srb9-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Srb9-HA ₆	Diese Arbeit
Med1-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med1-HA ₆	Diese Arbeit
Med5-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med5-HA ₆	Diese Arbeit
Med18-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med18-HA ₆	Diese Arbeit
Med15-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med15-HA ₆	Diese Arbeit
Med14-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med14-HA ₆	Diese Arbeit
Med19-6HA	MAT α sta1 sta2 sta3 STA10 hpt Med19-HA ₆	Diese Arbeit
<i>Escherichia Coli</i>		
DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	AG Schindelin

3.1.4 Verwendete Primer / Nukleotide

Alle Primer wurden bei Sigma Aldrich bestellt

Name	Sequenz
C-Terminal HA-Tagging	
Med1-6HA-S2(R)	CATCGAGTGACGGTCCACAATGTGTATTTGAGCCACTCCGTACCTCCTTAATC GATGAATTCGAGCTCG
Med1-6HA(S3)F_2	GATGTAATAATGCTGGAGTAAATTTATTGAAAATTTTCAGGATATCGTTAGCCG TACGCTGCAGGTCGAC
Med19-6HA_S2(R)	GAACACTTGCTCTTTATTTATAGTGGGGCTGATATGCGATGGCGTAAAGCTAA TCGATGAATTCGAGCTCG
Med19-6HA_S3(F)	CTACACCAACACATAGTGACAGTCATGAGGATATGAAAAGAAGGAGGCTGG AGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Med5-6HA_S2(R)	ATCATATCACCTTTATTAATATCTGTCTTATATATCAGGAGAGATGGCTCAATCG ATGAATTCGAGCTCG

Med5-6HA_S3(F)	GAAATTTATCAGTTATCACGATAAGTACTTGTGTATGCTGAAAACATGCGTATT CCGTACGCTGCAGGTCGAC
Med17-6HA-S2(R)	GGCATTCTATGGCAATGTATGTAGGTTTAAGGAGTGAAGTACTCAGGATATTAATCG ATGAATTCGAGCTCG
Med17-6HA-S3(F)	GAGGACTTCTACATTTTATTGTGCTGAGTACATCCAGCAAAAGAAGGTGC GTACGCTGCAGGTCGAC
Med2-6HA-S2(R)	GCACAACACGGTTTACAAGTCAATAGTTAACAATAGGAAGACCAAGCATATC GATGAATTCGAGCTCG
Med2-6HA-S3(F)	GGTCGACCACTGGAGATAATGGCGAATTAGACCTCAGCGGCTTCAATATA CGTACGCTGCAGGTCGAC
Srb9-6HA_S2(R)	AACTGGTAAATAGGGCTACAGATGAGCAGGAAAACGTTGCCGAAAAAGTT TAATCGATGAATTCGAGCTCG
Srb9-6HA_S3(F)	TTCCGCCGCTACTGTGCATACCGCTACTTCTTCATCAATTATTCTCTCGGA TAA ACGTACGCTGCAGGTCGAC
Kolonie-PCR	
KanHisNat (R)	GACTGTCAAGGAGGGTATTCTG
Med2-CTRL2 (F)	CAATCCTGGAGATAACCCTC
Med17-CTRL (F)	CTG AGC ACA AAA GCC CTA ATC
Med1-CTRL2 (F)	GAAAGACGTCAGTTCTAAGCC
Med5-CTRL (F)	AAGAGACATTCGTTTGCGG
Med19 CTRL (F)	CAATCCGGCTCAAATTCAGG
Srb9 CTRL (F)	GAAGTCTATTTCTCCAGTCG
Real Time PCR	
Aco1 Forward	TGGAAGCCAGGTTCCGGTATC
Aco1 Reverse	GCACCACCAACACCAATAGCC
Cit1 Forward	ACGCAGGGAGAGTTGTTCTG
Cit1 Reverse	CCCTGGGGCAACTTCATAAATGG
Rpl27A Forward	AGGGAGGAAAAAGCGTGGAGATG
Rpl27A Reverse	CCACTGCCTCGTATAGCTCAATG
Rpl33B Forward	TCCACCAAGTAGTAGGAGGCAC
Rpl33B Reverse	CGCAGTTATGTCAGAAGCGACC
Pre9 Forward	TGGCGCTAACACATCAGCAGC
Pre9 Reverse	AACCTGTCATAAGTCAGCGCGC
Act1 Forward	TGCCCCAGAAGAACCCTG
Act1 Reverse	AGGACAAAACGGCTTGGATGG
Rpl27A Forward	AGGGAGGAAAAAGCGTGGAGATG

3.1.5 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Iodacetamid	Sigma
DTT	Sigma
Agar	Serva
Dextrose	Sigma
Pepton	Serva
Acetonitril	Sigma
Methanol	Sigma
Aceton	Sigma
Chloroform	Sigma
Triflouressigsäure	Roth
Ameisensäure	Roth
Amylalkohol	Sigma
GlycoBlue™	Thermo Fisher Scientific
Natriumacetat	Sigma
dNTP's	PeqLab
Random (6er)	Roche
Salmon Sperm DNA	Sigma
SimplyBlue®	Thermo Fisher
QuickLoad Purple 2-Log DNA Ladder	NEB
Gel-Loading Dye Purple (6x)	NEB
Novex® Sharp Pre-Stained Marker	Invitrogen
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
10x Tris/Glycine	BioRad
cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor	Roche
Ponceau	Serva
Rapamycin	AdipoGen
Hygromycin	Serva
Ampicillin	Sigma
Genticin® G418- Sulfat	Serva

3.1.6 Verwendete Kits

Name des Kit	Verwendung	Hersteller
GeneJet PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR Produkten aus PCR-Mixtur	Thermo Fisher Scientific
Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit	Aufreinigung der genomischen DNA aus Zellysat	ZymoResearch
RNA Clean™ & Concentrator™ - 5	RNA Aufreinigung	ZymoResearch
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Aufreinigung von PCR Produkten aus Agarosegelen	ZymoResearch
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Plasmidisolierung aus 5ml <i>E.Coli</i> - Flüssigkulturen	ZymoResearch
High Pure RNA Isolation Kit	Isolierung und Aufreinigung der gesamt RNA	Roche
NucleoBond® Xtra Midi	Plasmidisolierung aus 200 ml <i>E.Coli</i> - Kulturen	Machery-Nagel
QuBit® dsDNA BR Assay Kit	Fluorometrische DNA Bestimmung	Life technologies
QuBit® RNA BR Assay Kit	Fluorometrische RNA Bestimmung	Life technologies
NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina®	cDNA Library Herstellung für RNA Sequenzierung	NEB(New England Bio Labs® Inc)
Yeast Nuclei Isolation Kit	Isolierung von Zellkernen aus Hefe-Flüssigkultur	BioVision

3.1.7 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Proteasen	
Trypsin Gold-Mass Sepc Grade	Promega
Papain (aus <i>Papaya Latex</i>)	Sigma Aldrich
Elastase	MP Biomedicals
Polymerase	
PWO-Polymerase	PEQ-Lab
Taq Polymerase	PEQ-Lab
MVL Reverse Transkriptase	Promega
Nukleasen	
DNase I, RNase-free	Thermo Scientific
Benzonase® Nuclease	Sigma Aldrich
Cyanase™ Nuclease	Serva

3.1.8 Verwendete Antikörper

Antikörper	Target	Verwendete Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper			
anti-FLAG	FLAG Tag	1 (:) 1000	Thermo Fisher Scientific
anti-HA	Hämagglutin Tag	1 (:) 1000	Cell Signaling Antibody
anti-HA	Hämagglutin Tag	1 (:) 1000	Santa Cruz Antibody
GADPH Loading CTRL	Glycerinaldehyd 3 phosphat dehydrogenase	1 (:) 1000	Thermo Fisher Scientific
Sekundärantikörper			
anti-mouse	Maus	1 (:) 3000	Cell Signaling Antibody
anti-rabbit	HRP linked secondary antibody	1 (:) 3000	Cell Signaling Antibody

3.1.9 Verwendete Geräte

Gerät	Name des Gerätes	Hersteller
UV-Spektrometer	Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystem
Kulturschüttler	Climo-Shaker ISF1-X	Kühner AG
Planetenmühle	PM100	Retsch
Schwingmühle	MM400	Retsch
Lyophylle	Alpha 1-2 LDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen
Tischzentrifuge (2ml)	5415	Eppendorf
Tischzentrifuge (50 ml)	5810 R	Eppendorf
High Speed Zentrifuge	Avanti® -J26XP	Beckman Coulter
Vakuums Zentrifuge	Concentrator plus	Eppendorf
Massenspektrometer	Orbitrap-Fusion	Thermo Fisher
Massenspektrometer	LTQ-Velos	Thermo Fisher
Flüssigkeitschromatograph	Easy-nLC 1000	Thermo Fisher
Chemilumineszenz Detektor	FluorChem Q	Alpha Innotech /Biozym
UV Transilluminator	Herolab Transilluminator	Herolab GmbH
Fluorometer	Qubit™ 3.0	Life technologies
Elektrophoresesystem	XCell SureLock™	Life technologies
Tank Blot	XCell™ Blot Module	Life technologies
Spannungsquelle	PowerPac™ Basic	BioRad

pH Meter	pH Meter	Schott
----------	----------	--------

3.2 Methoden

3.2.1 PCR-basiertes Anfügen eines Proteintags

Für eine Aufreinigung eines Zielproteins mittels Immunoprecipitation ist es notwendig, das Target mit einem geeigneten Protein, welches durch Antikörper erkannt werden kann zu fusionieren. Mittels Homologer Rekombination ist es möglich die Information für ein solches Protein an der gewünschten Stelle im Genom der Hefezelle stabil zu integrieren. Als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Rekombination dient eine Hygromycinresistenz.

3.2.1.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Das zu transformierende DNA fragment wurde mittels Zielgen-spezifischer Primer und dem Vektor pYM16 im Zuge einer Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) nach folgendem Protokoll synthetisiert:

Pro 50µl Reaktionsansatz		Cycler-Programm	
5'-3' (10µM) Primer S2(r)	3.2 µl		5min 98°C
3'-5' (10µM) Primer S3(f)	3.2 µl	30x	30sec 98°C
dNTP Mix (10µM)	1.75 µl		30sec 54°C
Template DNA (Vektor)	100 -200 ng		1.5 min 72°C
PWO Polymerase	3 µl		5 min 72°C
10xPWO Reaktionspuffer	5µl		

Das entstandene PCR-Produkt wurde mit dem GeneJet PCR Purification Kit aufgereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese auf seine korrekte Größe hin überprüft. Die Banden wurden mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit aus dem Gel präpariert und zur Sequenzierung (Eurofins) geschickt.

3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren verschiedene Mengen Agarose abgewogen und in 50 ml 1x TAE-Puffer aufgelöst.

Agarosekonzentration (%)	Einwaage pro 50 ml	Trennbereich DNA (bp)
0,3	0,15 g	5.000-60.000
0,6	0,3 g	1.000-20.000
0,8	0,4g	800-10.000
1	0,5 g	400-8.000
1,2	0,6g	300-7.000
1,5	0,75g	200-4.000
2	1g	100-3.000

Dies geschah unter dem Aufkochen der Suspension in der Mikrowelle. Sobald die gesamte Agarose sich aufgelöst hatte, wurde die Lösung auf etwa handwarm abgekühlt und mit 1µl G-Stain (Serva) versetzt. Nach dem Vermischen konnte das Gel gegossen werden und vollständig abkühlen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6xfachem DNA-Ladepuffer versetzt, gut gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 150 V.

3.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Hefezellen wurden bei 30°C und 230rpm bis zu einer optischen Dichte von ca. 0.6 wachsen gelassen. Eine Gesamtmenge von 50 OD wurde 5min bei Raumtemperatur abzentrifugiert (500g) und

im Anschluss mit sterilem Wasser und SORB-Lösung gewaschen. Die abzentrifugierten Hefezellen wurden dann in 360µl SORB und 40 µl Einzelstrang DNA (*Salmon Sperm DNA*) resuspendiert und in 50 µl Aliquote aufgeteilt und bei -80°C gelagert

3.2.1.4 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation der linearen DNA erfolgte nach dem Verfahren nach Gietz und Woods (Gietz and Woods, 2002). Chemisch kompetente Zellen werden aufgetaut und mit ca. 1-2µg des linearem PCR-Produktes und 300µl der einer 40% PEG-Lösung vermischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 40µl DMSO hinzugefügt, die Zellen 15 min bei 42°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden 2 min abzentrifugiert (2600 rpm), in 3 ml YPD Medium resuspendiert und 4-6 h bei 30°C und 230rpm geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die transformierten Zellen bei 500g abzentrifugiert und auf Hygromycinhaltigen (300µg/ml) Agarplatten ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C bildeten sich bei erfolgreicher Integration der linearen DNA einzelne Kolonien, welche dann auf frischen Hygromycinplatten vereinzelt wurden.

3.2.1.5 DNA Isolierung und Kolonie-PCR

Die gewachsenen Hefekolonien wurden gepickt und in 100 µl DNA-Lysepuffer resuspendiert (Löoke et al., 2011). Die Suspension wurde 5 min bei 70°C erhitzt. Um die DNA zu fällen wurde die Suspension mit 300µl 100% Ethanol versetzt und nach kurzem Durchmischen zentrifugiert (3min, 15.000g). Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und 5min trocknen lassen. Um unlösliche Bestandteile der Fällung zu entfernen, wurde das Pellet in 50µl Wasser gelöst und 15 Sekunden zentrifugiert. Die Konzentration der im Überstand enthaltene DNA wurde mittels des UV-Spektrometers bestimmt und wenn diese über 10 ng/µl lag für die Kolonie-PCR verwendet.

Ansatz (1x) 50 µl		Cycler Programm	
dNTPs (2.5 mM)	1µl		5min 94°C
f-Primer (CTRL Primer)	3.2 µl	30 x	1min 94°C
r-Primer (pYM16-CTRL)	3.2 µl		30sec 52°C
10x high specific buffer	5µl		40sec 72°C
DNA isolat (50-100 ng/µl)	5-10 µl		5min 70°C
TAQ Polymerase (1U/µl)	1µl		

Für eine Verifizierung der homologen Rekombination mittels PCR wurden die Primer wie folgt gewählt: Der forward-Primer(CTRL) bindet am C-terminalen Bereich des Zielgens, aber außerhalb des Bereichs, der für die Rekombination zwischen PCR-Fragment und Zielgens verantwortlich war. Der Reverse-Primer dagegen bindet im Bereich der Hämagglutinin-codierende Sequenz. Nur bei korrekter Integration des linearen PCR-Produktes kann ein PCR-Produkt entstehen, dieses hat dann je nach Position des forward-Primers eine Länge von 300 bis 500 Basen. Die korrekte Größe wurde nach der PCR durch ein Agarosegel verifiziert und die aufgereinigten PCR-Produkte durch die Firma Eurofins sequenziert.

3.2.2 Zellkultur und Zellaufschluss

3.2.2.1 Zellkultur

Alle Hefestämme wurden in einer 15% Glycerin-lösung bei -80°C gelagert. Bei Verwendung wurden die Zellen mit einer Impföse auf eine YPD-Agarplatte ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Agarplatten enthielten bei im Falle des Hefestamms S288c kein Antimykotikum. Die während dieser Arbeit generierten Hefestämme (siehe Tabelle) wuchsen aufgrund ihrer integrierten Resistenzgene auf Agarplatten die 300µg/ml Hygromycin enthielten.

Für einen Ansatz in Vollmedium (YPD) wurden zunächst 3ml YPD-Medium mit einer gepickten Kolonie angeimpft und über ca. 14-16h bei 30°C und 230rpm (Im folgendem als Standardbedingungen bezeichnet) inkubiert. Kulturmengen von 100 -300 ml wurden mit dieser Vorkultur versetzt (Start

OD₆₀₀=0.1) und bei 30°C und 230rpm inkubiert bis die gewünschte optische Dichte erreicht war. Für größere Kulturmengen (1 - 8l) wurde mit dieser Vorkultur eine 2. (200 ml) angesetzt weitere 16h inkubiert.

3.2.2.2 Stabile Isotopenmarkierung

Für einen vollständigen Austausch der ¹⁴N Atome zu ¹⁵N-Istopen wurden die jeweiligen Hefezellen gepickt und direkt in 3ml SD-Minimalmedium überführt. Dieses Medium enthielt aus Kostengründen statt 5g/l Ammoniumsulfat nur 1g/l. Auf einen Selektionsdruck mittels Hygromycin im Flüssigmedium wurde verzichtet. Dieser Ansatz wurde 16 h bei 30°C und 230rpm inkubiert und diente als Vorkultur für eine 200ml Kultur, die wieder 16 h bei 30° und 230rpm inkubiert wurde. Größere Ansätze (3 -4 l) wurden mit dieser 200ml-Vorkultur versetzt (Start OD₆₀₀= 0.15-0.2) und bei Standardbedingungen bis zu einer von OD₆₀₀=0.7-0.8 wachsen gelassen.

3.2.2.3 Zellernte

Die Hefezellen wurden mittels 15-minütiger Zentrifugation bei 7000g und 4°C geerntet. Das entstandene Pellet wurde dann einmal mit kaltem sterilem Wasser und einmal mit Tris-Lysepuffer gewaschen und zentrifugiert. Der Puffer wurde sorgfältig entfernt und das Pellet als solches bei -80°C eingefroren oder mit einem Spatel in eine 5ml Spritze ohne Kanüle überführt und in flüssigen Stickstoff gespritzt. Die dabei entstandenen Spagetti wurde bei -80°C gelagert.

3.2.2.4 Zellaufschluss durch Kryogrinding

Die eingefrorenen Zellen in Form von Spagetti wurden in einen mit Stickstoff vorgekühltem 50ml Stahlbecher gebracht. Dazu wurden drei 20mm Stahlkugeln gegeben, welche vorher ebenfalls mit Stickstoff gekühlt werden mussten. Der Behälter wurde fest verschlossen und nochmals mit Stickstoff gekühlt und in die Planetenmühle eingespannt. Der Aufschluss beinhaltete 8 Zyklen á 3min bei 500 rpm, wobei nach je einer Minute die Drehrichtung wechselte (Oeffinger et al., 2007). Zwischen jedem Zyklus wurde der Stahlbecher mit Stickstoff gekühlt. Nach dem Aufschluss wurde der Becher vorsichtig geöffnet, das entstandene Pulver mit einem tiefgefrorenen Stahlöffel in ein 50ml-Falcon überführt und bei -80°C gelagert.

3.2.2.5 Zellaufschluss durch Glaskügelchen

Für den Aufschluss mit Glaskügelchen wurde das Zellpellet in einem 50ml Falcon mit einer Menge eiskaltem Lysepuffer versetzt, die dem einfachen Pelletvolumen entsprach. Die Zellen wurden durch leichtes Schütteln aufgeschlämmt und das Volumen der Suspension am Rand des Falcons markiert. Aus dem -20°C Gefrierschrank wurden Glaskugeln entnommen und so viele in das Falcon gefüllt bis die Markierung erreicht war. Dann wurde das Falcon in die Spannvorrichtung der Schwingmühle MM400 eingespannt und 1 Minute bei 30 Hertz geschüttelt. Es folgte eine 3-minütige Inkubation auf Eis. Dieser Vorgang wurde 5 Mal wiederholt.

3.2.3 Proteinanalytische Methoden

3.2.3.1 Immunopräzipitation

Für jede Immunopräzipitation wurden vom getaggtten Stamm und der Wildtyp-Kontrolle je ein 1g des durch Kryogrinding gewonnenem Pulvers abgewogen, mit je 5ml Lysepuffer mit Additiven (siehe Puffer) versetzt und auf Eis aufgetaut. Die Suspensionen wurden nacheinander in einem 15ml Homogenisator umgefüllt und durch 4 Hübe weiter vermischt. Jedem Lysat wurden 50U/ml Cyanase oder Benzonase hinzugefügt, die Suspension gut geschüttelt und in einem 20-minütigem Zentrifugationsschritt alle unlöslichen Bestandteile und unaufgeschlossene Zellen aus dem Lysat entfernt. In der Zwischenzeit wurden 2 Aliquote von je 100µl magnetischer Beads mit gekoppelten anti-HA Antikörpern 3 Mal mit je 1ml des jeweiligen Lysepuffers gewaschen und auf Eis bereitgestellt. Von jedem zentrifugiertem Lysat wurden 100µl für eine Proteinbestimmung mittels Bradfordassay und für eine Western Blot Kontrolle entnommen. Das restliche Lysat inkubierte zusammen mit den gewaschenen Beads 2h bei 4°C auf

einem Rotator. Die eingesetzte Menge an Lysat entsprach in den meisten Fällen 4.2 ml, wurde aber bei Konzentrationsunterschieden des Proteingehaltes zwischen dem Lysat des getaggtten Stammes und dem Wildtyp angepasst. Die eingesetzte Gesamtmenge an Protein betrug in den meisten Fällen 25-30 mg pro 100µl Bead-Suspension, jedoch nie weniger als 20mg. Nach den 2h Inkubation bei 4°C wurde das Lysat von den magnetischen Beads entfernt und eine weitere Probe für eine Western Blot Analyse aufgehoben. Dann folgten 4 Waschschrte mit jeweils 1ml, 1.5ml und 2 ml mit dem jeweiligen Lysepuffer ohne Additive für jeweils 5 Minuten bei 4°C. Die Elution erfolgte jeweils mit 100µl einfachem LDS-Puffer ohne Reduktionsmittel für 15min bei 37°C und 400rpm. Die Beads wurden vom Eluat abgetrennt und verworfen. Die Eluate der beiden Immunopräzipitationen wurden vermischt, mit 800µl reinem Aceton versetzt und über Nacht (mindestens aber 12 h) bei -20°C inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden in einem Zentrifugationsschritt pelletiert und zweimal mit jeweils 1ml Aceton gewaschen. Das Aceton wurde vorsichtig vom Pellet entfernt und verbleibende Acetonreste verdampften bei Raumtemperatur. Das Pellet konnte getrocknet bei -20°C gelagert werden.

3.2.3.2 Bradford Assay

Der Bradford Assay ist eine kolorimetrische Methode der Proteinbestimmung (Bradford, 1976). Sie beruht auf der Verschiebung des Coomassie®-Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595nm nach Proteinbindung in saurem Medium. Für eine Standardkurve wurden je 3 Replikate von 7 Standardwerte mit BSA hergestellt: 2mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml und 0.125mg/ml. Als Verdünnungsmittel und als Referenz diente eine 1:20 Verdünnung des Lysepuffers mit Wasser. Von jedem Lysat wurden 3 Verdünnungen im Maßstab 1:20 mit Wasser hergestellt und davon 40µl mit 2ml Bradfordreagenz vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation wurden die Proben bei 525 nm vermessen und der Proteingehalt mit Hilfe der Standardkurve ermittelt.

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (kurz SDS-PAGE) dient der Proteinauftrennung nach ihrer Größe beziehungsweise ihres Molekulargewichtes. Die dabei zu untersuchenden Proteine aus der Acetonfällung wurden dabei mit 25µl LDS Probenpuffer (Invitrogen) inklusive Reduktionsmittel (50mM DTT) versetzt und 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Dabei denaturieren die Proteine und die Moleküle des ionischen Detergenz Lithium-Dodecylsulfat lagern sich an das Proteinerückgrat. Durch das Reduktionsmittel DTT werden indes alle Disulfidbrücken zwischen Proteinen reduziert und damit gelöst. Die dabei entstehenden freien Cysteinreste wurden im Anschluss durch die Zugabe von Iodacetamid (Endkonzentration 110mM) zu Carbamidomethylresten modifiziert. Dies erfolgte 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nur mit dieser Modifizierung ist es möglich die cysteinhaltige Peptide im MS-Spektrum zu identifizieren. Die reduzierten und alkylierten Proben wurden auf ein Bis-Tris Polyacrylamidgel (Invitrogen) mit einem Gradienten von 4%-12% aufgetragen, die Gel- und Außenkammern mit MOPS-Laufpuffer befüllt und eine Spannung von 200V angelegt. Nach 50 Minuten wurde das Gel aus der Gelkassette entnommen und dreimal mit destilliertem Wasser für je 10 Minuten auf einem Kippschüttler inkubiert. Um die aufgetrennten Proteine zu visualisieren, wurde das Gel 1h mit einer coomassiehaltigen Färbelösung (SimplyBlue®) inkubiert und im Anschluss eine Stunde in destilliertem Wasser entfärbt.

3.2.3.4 Western Blot Analyse

Bei einer Western Blot Analyse werden die auf einem SDS-Acrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, wo sie dann für Antikörper zugänglich sind. Hierfür wird das Gel nach der Elektrophorese nicht gefärbt, sondern nur 3 Mal mit Wasser gewaschen und die Lauffront und die Taschen abgetrennt. 4 Schwämme, 2 zurechtgeschnittene Whatman-Papierstücke und eine zurechtgeschnittene Nitrocellulosemembran wurden in Laufpuffer getränkt und dann wie in Abbildung 20 zusammengesetzt.

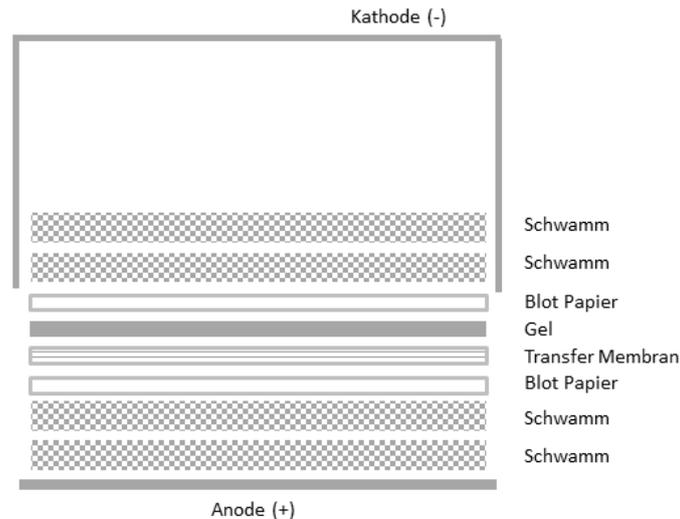


Abbildung 20 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots

Beim Zusammensetzen wurde darauf geachtet, dass keinerlei Luftblasen zwischen dem Gel und der Transfermembran verbleiben. Die Apparatur wurde komplett zusammengesetzt und die innere Kammer mit Transferpuffer befüllt. Die äußere Kammer wurde mit Eis und Wasser befüllt und eine Spannung von 30V für 1h angelegt. Danach wurde die Nitrocellulosemembran vorsichtig vom Gel getrennt und circa 30 Minuten in 5%iger Milchlösung inkubiert. Dann wurden 5ml der 5% Milchlösung mit 5 μ l Primärantikörper versetzt und entweder 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit TBST wurde die Membran mit 5ml der 5% Milchlösung und 5 μ l des Sekundärantikörpers versetzt und wieder 1h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 3 weiteren Waschschrritten mit TBST. Die Membran wurde noch einmal kurz in Wasser geschwenkt und dann mit 1ml der ECL-Lösung versetzt. Diese enthielt zu gleichen Teilen die Lösung A (mit Luminol) und Lösung B (mit H₂O₂)

3.2.4 Massenspektrometrische Methoden

3.2.4.1 Reduzierung und Alkylierung

Die Reduzierung der eluierten Proteine dient dem Aufspalten von Disulfidbrücken. Dadurch werden Tertiärstrukturen innerhalb von Proteinen und kovalente Bindungen zwischen 2 Proteinen aufgebrochen. Die Reduktion erfolgte nach der Acetonfällung der Elution. Das Pellet wurde gut trocken gelassen um alle Acetonreste zu entfernen. Dann wurden 25 μ l des 1-fachen LSD-Puffers hinzugegeben, dieser enthielt DTT in einer Endkonzentration von 50 mM. 10 min bei 70°C erhitzt. Dabei werden alle Disulfidbrücken reduziert. Die Probe wurde kurz abgekühlt und mit einer 1 M Lösung Iodacetamid versetzt (Endkonzentration 119 mM) und gut vermischt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation

3.2.4.2 Proteinverdau im Gel

Um Proteine noch im Polyacrylamidgel zu verdauen, muss das Gel zunächst in einzelne Abschnitte zerteilt werden. Die Intensität der angefärbten Proteinbanden gibt Aufschluss darüber, in welchen Bereichen des Gels besonders viele Proteine angereichert wurden. Diese Bereiche wurden dann in kleinere Stücke geschnitten, als solche die kaum angefärbt waren und somit weniger Protein enthielten. Letztendlich wurde das Gel immer in 15 Abschnitte zerteilt und diese nochmals grob zerkleinert in 15 Low-Binding Eppendorfgefäß überführt. Sowohl das Coomassie als auch das Lithiumdodecylsulfat müssen vor dem tryptischen Verdau aus der Probe entfernt werden. So wurden zu jedem zerkleinerten Gelstück 400 μ l Entfärbelösung gegeben und die Eppendorfgefäße für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (600rpm) entfärbt. Die Lösung wurde von den Gelstückchen entfernt und es folgte ein 10-minütiger Waschschrtritt mit 400 μ l einer

Ammoniumbicarbonatlösung (ABC-Puffer 100mM) und eine 5-minütige Inkubation mit reinem Acetonitril. Dies hatte zur Folge, dass die Gelstückchen dehydrierten und zusammenschrumpften. Das Acetonitril wurde von den Gelstückchen entfernt und verbliebene Lösungsmittelreste in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Diese entfärbten und getrockneten Gelstücke konnten nun entweder bei 4°C gelagert oder mit einer Protease verdaut werden. Im zweiten Fall wurden 10µl einer Enzymlösung (Trypsin (0.1µg), Papain oder Elastase) direkt dazu gegeben und ca. 100µl ABC-Puffer hinzugefügt um das Gelstückchen vollständig zu bedecken. Dann wurden alle 15 Proben für mindestens für 10 Stunden für den Verdau in einen 37°C Inkubator gestellt. Die entstandenen Peptide wurden mit einer Pipette mit Gelloader- Spitze abgesaugt und in ein HPLC-Vial überführt. Die verbliebenen Gelstücke wurden anschließend mit 10µl 0.5%iger Ameisensäure versetzt und 15min bei 600rpm inkubiert. Die sich dadurch gelösten Peptide wurden mit den zuvor extrahierten vereint. Das durch die Ameisensäure im ABC-Puffer entstehende CO₂ wurde durch einen kurzen Zentrifugationsschritt entfernt.

Enzym	Bedingungen
Trypsin	37°C, über Nacht (mind.10h) in 100mM ABC Puffer
Elastase	37°C, über Nacht (mind.10h) in 100mM ABC
Papain	37°C, über Nacht (mind.10h) in 100mM ABC, 5mM Cystein

Tabelle 3 Reaktionsbedingungen der verwendeten Enzyme für den Proteinverdau im Gel

3.2.4.3 Proteinverdau in Lösung

Beim Verdau einer Proteinprobe in Lösung, werden die Proteine der Probe nicht über Gel aufgetrennt, sondern zusammen präpariert, verdaut und vermessen. Die aufwendige Präparation aus dem Gel wird damit umgangen da die Probe wird in einem MS-Lauf gemessen und nicht in 15 Fraktionen aufgeteilt.

Dafür wurden die mit 1xLDS Puffer eluierten Proteine vor der Acetonfällung reduziert und alkyliert. In die 100µl Elution wurden 11µl der 500mM DTT Lösung gegeben, alles gut vermischt (10 Sekunden vortexten) und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit einer 1M Lösung Iodacetamid versetzt (Endkonzentration 120mM) und im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Acetonpräzipitation in einem *low-Binding* Eppendorf Gefäß. Das Aceton wurde einem -20°C Eisschrank entnommen und in 4-fachem Überschuss auf die Probe gegeben. Nach einem Vermischen der Flüssigkeiten wurde das Eppendorfgefäß mindestens 60 Minuten bei -20°C inkubiert und die Proteine präzipitiert. Das so gewonnene Proteinpellet wurde 2mal mit Aceton gewaschen, dann getrocknet und anschließend in einer frisch angesetzten 8 molaren Urea-Lösung (in 100 mM ABC) aufgelöst. Mittels eines Nanodrops wurde die ungefähre Proteinkonzentration bestimmt. Je nach Konzentration der Proteine in der Probe 5-10 µl einer Lys-C Lösung (0.05µg/µl) hinzugegeben und der Ansatz vermischt. Für den Verdau wurde das Eppendorfgefäß für 2h bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte ein 2. Verdau mit Trypsin. Hierfür wurde der Ansatz 1:3 mit ABC-Puffer verdünnt je nach Proteinkonzentrationen 0.25 – 0.5µg/Trypsin hinzugegeben. Der zweite Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

Enzym	Menge	Bedingungen
Trypsin	0.25-0.5 µg	2M Urea, 100mM ABC, 37°C, über Nacht
Lys-C	0.25-0.5 µg	8M Urea, 100mM ABC, 2h, 30°C

Das Salz, SDS und auch hohe Urea Konzentrationen stören den Ablauf der Chromatografie und der Ionisierung. Aus diesem Grund müssen die entstandenen Peptide davon abgetrennt werden. Dies erfolgte über das sogenannte StageTipping. Hierbei wird dir zuvor angesäuerte Peptidlösung (Triflouressigsäure-Endkonzentration 0.5%) durch eine herkömmlichen 200µl-Spitze pipettiert, die C18-Material enthält. Die Peptide binden an das C18-Material, werden durch das umspülen und mit Waschlösungen von Salzen und Detergenzien befreit und mit Acetonitril eluiert.

Protokoll		
Vor-Waschen	50 µl MeOH	→ zentrifugieren
Waschen	50µl 60% Acetonitril, 0.3% Ameisensäure	→ zentrifugieren
Äquilibrieren (2x)	50µl 2% Acetonitril, 0.3% Trifluoressigsäure	→ zentrifugieren
Probe laden		→ zentrifugieren
Waschen (3x)	50µl 2% Acetonitril, 0.3% Trifluoressigsäure	→ zentrifugieren
Eluieren (2x)	5µl 60% Acetonitril, 0.3% Ameisensäure	→ zentrifugieren

Das gewonnen Eluat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann über Nacht in eine Lyophylle gestellt um die Flüssigkeit von Peptiden abzutrennen. Die getrockneten Peptide wurden direkt vor der MS-Messung mit 25µl einer 2%iger Acetonitrillösung mit 0.1% Ameisensäure versetzt und die Peptidkonzentration mittels eines Nanodrops vermessen.

3.2.5 Analyse der MS-Daten

3.2.5.1 Datenprozessierung und Datenbanksuche

Alle Datensätze wurden im *raw*-Datenformat mit der Software Macot Distiller (Version 2.5.1, 64-bit, Matrix Science) prozessiert, identifiziert und quantifiziert. Dabei handelte es sich bei jedem Triplikate um 45 LC-MS/MS Läufe die als ein Multi-File-Projekt zusammengefasst wurden. Die Datenbanksuche der detektierten Peptide erfolgte über den Mascot Server (version 2.5.1, Matrix Science), wobei auf das UniProt Referenz-Proteom von *Saccharomyces cerevisiae* S288c (ID: UP000002311, Tag des Downloads: 02.05.2015, reversiert verknüpft) und eine hauseigene Kontaminationsdatenbank (245 Einträge) zugegriffen wurde. Folgende Suchparameter wurden eingestellt: Verdau durch Trypsin mit bis zu 3 Fehlsplaltungen; feststehende Modifikationen: Carbamidomethylierung an allen Cysteinen; variable Modifikationen: Acetylierung am N-terminus, Umwandlung von N-terminalem Glutamin zu Pyroglutamat, Oxidation der Thioethergruppe in Methionin; Peptidmassentoleranz: 10 ppm und Fragmentmassentoleranz: 0.02 Da. Als Standardeinstellungen für die Quantifizierung wurde ein 99.5%iger Anteil ¹⁵N Atome in jedem ¹⁵N-markierten Peptiden angenommen und ein minimaler Peptidscore von 15 bestimmt.

3.2.5.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte durch das Programm Mascot Destiller. Die errechneten ¹⁴N/¹⁵N Werte für alle identifizierten Proteine wurden als „Complete xml“ Datei exportiert und in mit einem in der Arbeitsgruppe geschriebenen R-Skript (Version R 3.1.2) in eine Datentabelle umgewandelt, welche von jedem Peptid den PSM-Identifikationsscore (*peptide spectrum match identification score*) und das Verhältnis zwischen leichter und schwerer Isoform enthält. Für das Filtern nach der sogenannten *false-discovery-rate* (FDR) wurde diese Peptidetabelle in eine Tabelle umgewandelt, in der jede Zeile einen Identifikationshit repräsentiert (*PSM quant table*). Diese Tabelle wurde nach dem Mascot Score sortiert und nach der FDR gefiltert (q<0.01). Die FDR richtet sich nach der Anzahl und Intensität der Proteinhits aus der Decoy Datenbank. Dabei handelt es sich um eine Datenbank die alle Peptide enthält, die bei einem „in silico“ Verdau aller invertierten Proteine des jeweiligen Organismus entstehen würden. Diese „Reverse“-Identifizierungen, Identifizierungen aus der Kontaminationsdatenbank, Peptide mit einem *Mascot search rank* unter 1 und Proteine mit weniger als 2 Peptiden, die strukturell verschieden sind und eindeutig diesem Protein zugeordnet werden konnten, wurden aussortiert. Für den Fall, dass zu einem Peptid weder das schwere oder leichte Gegenstück für eine Quantifizierung herangezogen werden konnte, würden extrem hohe oder extrem niedrige ¹⁴N/¹⁵N-Relationen durch das Programm Mascot errechnet werden. Diese fehlenden Intensitäten wurden durch Werte nahe der Basislinie des Spektrums ersetzt.

Für die statistische Auswertung wurden alle gefilterten Proteine nach ihrer Intensität sortiert. Von den $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Werten der 300 intensivsten Proteine wurde ein Boxplot erstellt (Abbildung 21). Dieser enthält in der Box 50% dieser Werte, alle anderen liegen entweder innerhalb der „Whiskers“ oder außerhalb und werden dann als Ausreißer bezeichnet. Diese Proteine liegen demnach mit einer gewissen Signifikanz außerhalb der Verteilung der Proteine, die den unspezifischen Hintergrund ausmachen. Die Länge der Box beschreibt den interquartilen Abstand (IQR).

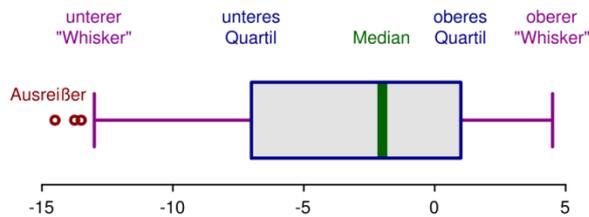


Abbildung 21 Darstellung eines Boxplots (Bildquelle: www.wikipedia.de)

Liegt die Entfernung eines „Ausreißersproteins“ zum Median zwischen dem 1,5- und 3fachen des Interquartilsabstandes, bekommt es als Wert für die Signifikanz „1“. Beträgt der Wert mehr als das 3fache, ist dieser Ausreißer extrem und dieses Protein erhält die Signifikanz „2“. Im nächsten Schritt wird dieser Vorgang um eine Zeile der Proteinliste verschoben. Es wird ein Boxplot von den Proteinen Nr.2 bis 301 erstellt und für die Ausreißer wieder die Signifikanz ermittelt. Diese Vorgehensweise berücksichtigt den Umstand, dass die $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Werte weniger intensiver Peptide eines Proteins eine höhere Varianz aufzeigen. Boxplots im unteren Intensitätsbereich werden somit einen größeren interquartilen Abstand haben und auch längere Whisker. Des Weiteren wurden Proteine, die zwar als Ausreißer identifiziert wurden, deren Peptide aber eine zu hohe Varianz in ihren $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Relationen aufweisen als nicht signifikant betrachtet. Zu diesem Zweck wurde für jedes Protein ein individueller Boxplot erstellt, der alle dazugehörigen $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Werte der dazugehörigen Peptide darstellt und das Kerbenintervall (*Notch*) berechnet.

$$\text{Kerbenintervall (Notch)} = \text{Median} \mp 1.55 \times \text{IQR} \div \sqrt{n(\text{Anzahl der Peptide})}$$

Überlappt das Kerbenintervall des Proteins nicht mit dem Median und auch nicht mit dem Median aller Kerbenintervalle, hebt es sich signifikant vom unspezifischen Hintergrund ab.

Für replizierte Experimente (in den meisten Fällen Triplikate) wurden die $\log_2(^{14}\text{N}/^{15}\text{N})$ aller Proteine einer Quantil-Normalisierung unterzogen. Die dabei ermittelten Medianwerte ($\text{median } \log_2(^{14}\text{N}/^{15}\text{N})$) waren dann wieder Ausgangslage für die vorher beschriebene Boxplotanalyse. Proteine, die dabei als extrem signifikante Ausreißer (Signifikanz 2) identifiziert wurden, konnten in drei Kategorien unterteilt werden:

- Proteine der **Kategorie I** sind mit größter Gewissheit signifikant und wurden in allen drei Einzelexperimenten mit einer Signifikanz von 2 ermittelt (2-2-2) oder in maximal einem Replikat mit nur einer Signifikanz von 1 (2-2-1).
- Proteine der **Kategorie II** sind mit großer Gewissheit signifikant und haben in 2 Experimenten eine Signifikanz von 2 (2-2-0) oder in nur einem eine Signifikanz von 2 und in den anderen zwei Replikaten eine Signifikanz von 1 (2-1-1) oder in maximal einem Experiment eine Signifikanz von 0 (2-1-0) oder in allen drei eine Signifikanz von 1 (1-1-1).

- Proteine der **Kategorie III** sind mit Gewissheit signifikant und beinhalten alle anderen Proteine die als Triplikat als extreme Ausreißer identifiziert wurden

3.2.6 RNA-analytik

3.2.6.1 RNA-Isolierung aus dem IP-Eluat

Die Proteine und die assoziierte RNA wurden mit einer 1x LDS Lösung eluiert. Dafür wurden 100 µl dieser Lösung den Beads zugesetzt und das Eppendorfgefäß kurz geschüttelt, bis sich die Beads von der Gefäßwand lösten. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C und 400rpm. Dann wurde das Eluat durch die Verwendung eines Magnetständers von den Beads getrennt, in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und mit 300µl ddH₂O versetzt. Eine Mischung aus Chloroform, saurem Phenol (pH 4) und Isoamylalkohol in einem Mischungsverhältnis von 24:25:1 wurde frisch angesetzt und 400µl davon dem verdünnten Eluat beigegeben. Das Eppendorfgefäß wurde fest verschlossen, 10 Sekunden auf einen Vortexmischer gehalten und 1 min auf einem Schüttler inkubiert. Um die Phasen zu trennen, wurde das Gemisch für 3 Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (16.100 rpm). Die obere, wässrige Phase wurde von der organischen getrennt und nochmals mit 400µl des Chloroform:Phenol:Isoamylalkohol Gemisches versetzt und durchmischt. Die wässrige Phase wurde nach dem Zentrifugieren mit 400µl reinem Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert. Im Anschluss wurde die wässrige Phase entnommen und 40µl einer 3M Natriumacetat-Lösung und 1.5 µl GlycoBlue™ (15mg/ml) dazugegeben und alles gut gemischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch die Zugabe von 96-100% Ethanol aus dem -20°C Gefrierschrank Ethanol (1m) und der Inkubation des Gemisches bei -20° über Nacht. Im Anschluss wurde die Präzipitierte RNA durch 10 –minütiges Zentrifugieren (4°C, 16.100 rpm) vom Ethanol abgetrennt und die RNA 1-mal mit 400µl eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet trocknete 5 Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann in 25µl ddH₂O (RNase-/DNase-frei) gelöst. Die RNA Konzentration wurde über eine Messung am UV-Spektrometer bestimmt (NanoDrop) und der Anteil von DNA mittels einer Fluoreszenzmessung am QuBit bestimmt. Konnte noch DNA nachgewiesen werden, wurde die RNA durch den RNA Clean™ & Concentrator™ nochmals gereinigt.

3.2.6.2 QuBit™ Assay

Das QuBit Assay basiert darauf das Protein-, RNA- und DNA-spezifischer Fluorophore in einer Probe gezielt an Ihre Targets binden und dadurch ihr Fluoreszenzspektrum verschieben. Durch separates Einsetzen der Fluorophore kann spezifisch in einer Probe zwischen RNA und DNA unterschieden werden. Das jeweilige Fluorophor wurde 1:200 mit dem QuBit™ Puffer vermischt und konnte direkt eingesetzt werden. Entweder wurden 190µl dieser Verdünnung mit 10µl einer Standardlösung vermischt oder 198 µl mit 2µl einer Probe. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung vermessen.

3.2.6.3 RNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten RNA erfolgte durch Julia Hofstetter aus der AG Wolf. Die Konzentration und Größe der RNA wurde zunächst durch einen Bioanalyzer bestimmt. Die darauffolgende cDNA Synthese und Erstellung einer Library für die RNA-Sequenzierung erfolgte über den erfolgte über das NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit für Illumina®. Dabei wurde das Protokoll 3 für mRNA und Ribosomen-abgereicherte RNA-Proben verwendet

3.2.6.4 Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurde zunächst die gesamt RNA aus 4ml Flüssigkultur gewonnen. Dafür wurde der High Pure RNA Isolation Kit von Roche verwendet. Das detaillierte Extraktionsprotokoll kann dem Manual entnommen werden. Nach erfolgreicher Isolierung wurde die gereinigte RNA durch die MLV Reverse Transkriptase in cDNA übersetzt. Hierfür wurde die RNA zunächst in 15µl Wasser auf eine

Konzentration von 2µg/15µl verdünnt und erhitzt (siehe Tabelle) und dann mit dem Mastermix versetzt. Jede RNA-Probe wurde mit einem Mastermix mit und ohne reverse Transkriptase versetzt. Die Ansätze ohne reverse Transkriptase dienten als Negativkontrolle.

1x Ansatz		Programm	
Gesamt RNA	2µg in 15µl ddH ₂ O	1x	2min 65°C
		1x	1min 4°C
		1x	2h 25°C
+ 35µl Mastermix		Programm	
MMB-MVL Reaction Buffer (5x)	10µl	1x	10 min 25°C
dNTP's (2.5 mM)	5µl	1x	50min 37°C
Random (6er)	2µl	1x	5min 70°C
RNase-Inhibitor RiboLock)	0.2µl	1x	4°C
Reverse Transkriptase (MVL)	1µl		
ddH ₂ O	16.8µl		

Die Ansätze wurden 1:20 mit ddH₂O vermischt und dienten bei der RT-PCR Reaktion als Template

Pro Ansatz	
Template (cDNA)	10µl
Premix Absolute QPCR Mix, SYBR Green	8µl
Forward-Primer	1µl
Reverse-Primer	1µl

Ergebnisse

4.1 Methodenetablierung zur Isolierung des Mediators aus *Saccharomyces Cerevisiae*

4 Der Mediator Komplex hat eine Größe von über 1 MegaDalton und besteht aus 25 Untereinheiten. Seine Zusammensetzung sowie seine strukturelle Integrität sind flexibel und von seiner Funktion abhängig. Um ihn in innerhalb seiner vielen funktionalen Facetten zu erfassen und mittels Massenspektrometrie zu analysieren, war es notwendig ein Protokoll zu etablieren, welches es ermöglicht diesen Komplex intakt und unter physiologischen Bedingungen zu isolieren. Gleichzeitig sollten dabei so viele Interaktionen und Modifikationen erhalten bleiben, wie möglich, um Rückschlüsse auf die vielfältigen, zellulären Funktionen zu gewinnen. Die beste Position des Affinitätstags, die schonendste und gleichzeitig effiziente Methode der Zellyse und ein verlustarmes Protokoll bei der Immunopräzipitation waren die Ziele der Methodenetablierung.

4.1.1 Anfügen eines C-terminalen HA-Tags mittels homologer Rekombination

Das Anfügen eines Affinitätstags ist eine gängige Methode, das Zielprotein aus einer komplexen Proteinmischung mittels eines Antikörpers zu isolieren. Die künstliche Verlängerung des Zielproteins kann jedoch zu einer funktionellen Einschränkung des gesamten Komplexes führen oder auf Grund der Proteinfaltung für den Antikörper während der IP gar nicht oder nur schlecht zugänglich sein. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob mit verschiedenen Untereinheiten oder Modulen, sich unterschiedliche Interaktionspartner isolieren lassen. Aus all diesen Gründen wurden mehrere Untereinheiten aus verschiedenen Modulen des Mediators mittels homologer Rekombination im Genom an ihrem C-Terminus um eine Sequenz verlängert, die eine 6-fache Wiederholung des Glycoprotein Hämagglutinin des Influenzavirus A codiert (Abbildung 22). Dies erfolgte über das PCR-basierte C-Terminale Epitoptagging (Knop et al., 1999; Schneider et al., 1995), da es diese Methode erlaubt, das gewünschte Protein auf Genomebene zu modifizieren. Dies hat den großen Vorteil, dass der Mediator unter seinen physiologischen Bedingungen analysiert werden kann, insofern der Tag die Proteinfunktion nicht beeinflusst.

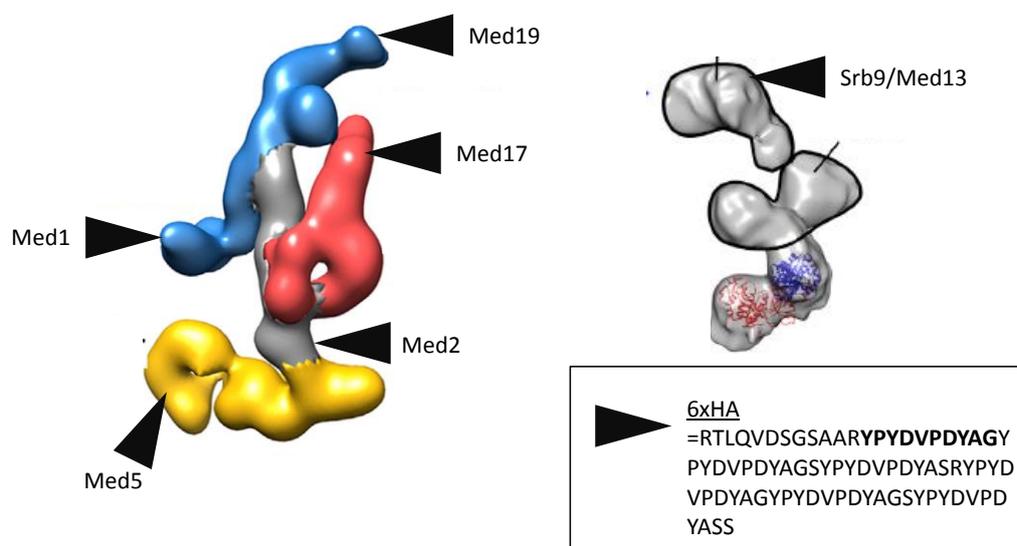


Abbildung 22 Schematische Übersicht über die Positionen der erzeugten und verwendeten C-Terminal HA-getagten Untereinheiten des Mediator Komplexes (modifiziert nach (Tsai et al., 2014)). Jeder erzeugte Stamm enthielt nur einen Affinitätstag. Das schwarze Dreieck symbolisiert das angefügte Peptid, dessen Aminosäuresequenz im unteren Bildrand angezeigt ist.

Für jede Untereinheit wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ein spezifisches ca. 2kb langes lineares DNA-Fragment generiert. Dieses bestand aus der codierenden Sequenz des C-Terminus des Zielproteins ohne Stop-Codon, der Sequenz für einen 6-fachen HA-TAG, dem Stop-Codon, einer Hygromycinresistenz und dem nicht-codierenden Bereich nach dem Stopcodon des Zielproteins (Abbildung 23 und Abschnitt Polymerase Ketten Reaktion (PCR)3.2.1). Jedes PCR-Produkt wurde vor der Transformation mittels Gelelektrophorese auf seine richtige Größe und eventuelle Nebenprodukte kontrolliert (Abbildung 23) und sequenziert.

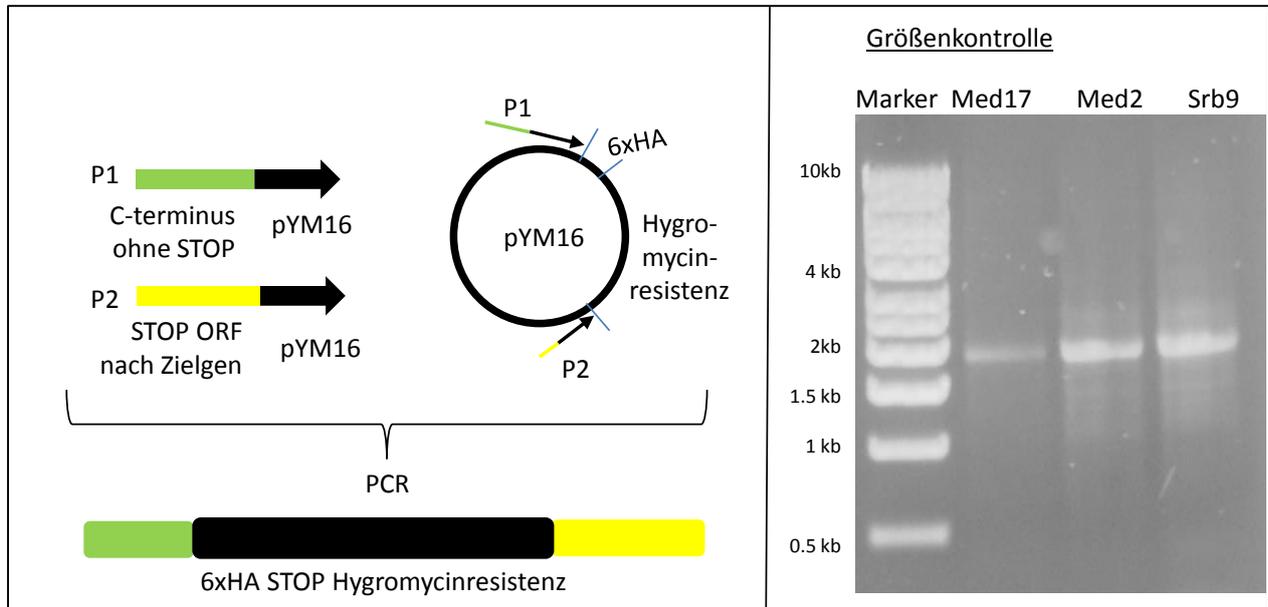


Abbildung 23 Links: Schematische Darstellung der Erzeugung des 2kb-PCR-Fragmentes für die Transformation. **Rechts:** Größen- und Qualitätskontrolle der PCR-Produkte für die C-terminale HA-Fusion der Untereinheiten Med17, Med2 und Srb9.

Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock in chemokompetente Hefezellen (Methodenteil 3.2.1.2) und die Selektion durch die Inkubation auf Hygromycin-haltigen Agarplatten (300µg/ml). Die erfolgreiche und fehlerfreie Rekombination des PCR-Produktes in das Hefegenom wurde durch eine Kolonie-PCR validiert. Hierfür wurden jeweils Primerpaare gewählt die innerhalb der Hygromycinresistenz und vor dem Bereich Rekombination lagen. Die bei erfolgreicher Transformation entstanden PCR-Produkte wurde im Rahmen einer Gelelektrophorese auf ihre korrekte Größe (Abbildung 24) und mittels Sequenzierung auf Fehler während der Rekombination überprüft.

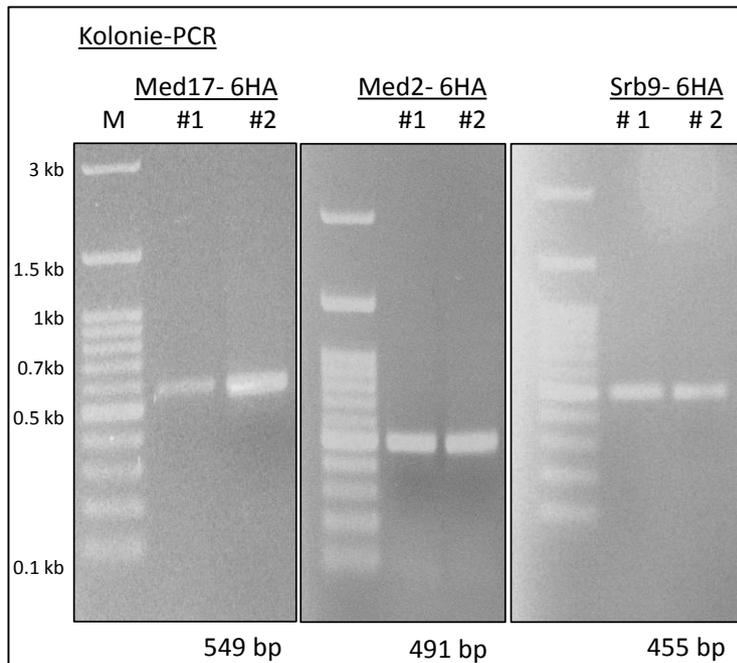


Abbildung 24 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte nach der Kolonie-PCR der Transformanten Med17-HA, Med2-HA und Srb9-HA. Von jeder Transformation wurden mindestens 2 Transformanten auf erfolgreiche Rekombination getestet. Die im unteren Bildrand Nukleotidlängen, entsprechen den berechneten Längen auf Grund der theoretischen Primerpositionen.

Jede markierte Untereinheit, die für weitere Experimente verwendet werden sollte, wurde einer Test-Immunopräzipitation (Test IP) unterzogen, um sicher zu stellen, dass der HA-TAG für die Antikörper zugänglich ist und sich das markierte Zielprotein isolieren lässt (Abbildung 25). War dies der Fall, wurde die isolierte Untereinheit mittels SDS-PAGE isoliert, der das Zielprotein enthaltene Gelbereich ausgeschnitten und die sich darin befindenden Proteine mit Trypsin verdaut. Die Peptide wurden mittels MS/MS analysiert. Wurde die getaggte Mediatoruntereinheit identifiziert und auch Übergangspeptide gefunden die sowohl den C-Terminus als auch den Anfang des HA-Tags umspannten, wurde die Transformation als erfolgreich validiert angesehen (Abbildung 25) und die Zellen für weitere Experimente verwendet. Um auszuschließen, dass der Hämagglutinin-tag einen generellen Einfluss auf das Zellwachstum hat, wurden von jedem getaggtten Stamm Wachstumskurven in Minimalmedium angefertigt. Stellte sich heraus, dass die C-terminale Fusion zu einem Wachstumsdefizit im Vergleich zum Wildtyp führte, wurde der Stamm nicht für weitere Experimente verwendet. Eine Übersicht über die Wachstumskurven aller verwendeten Stämme befindet sich im Anhang.

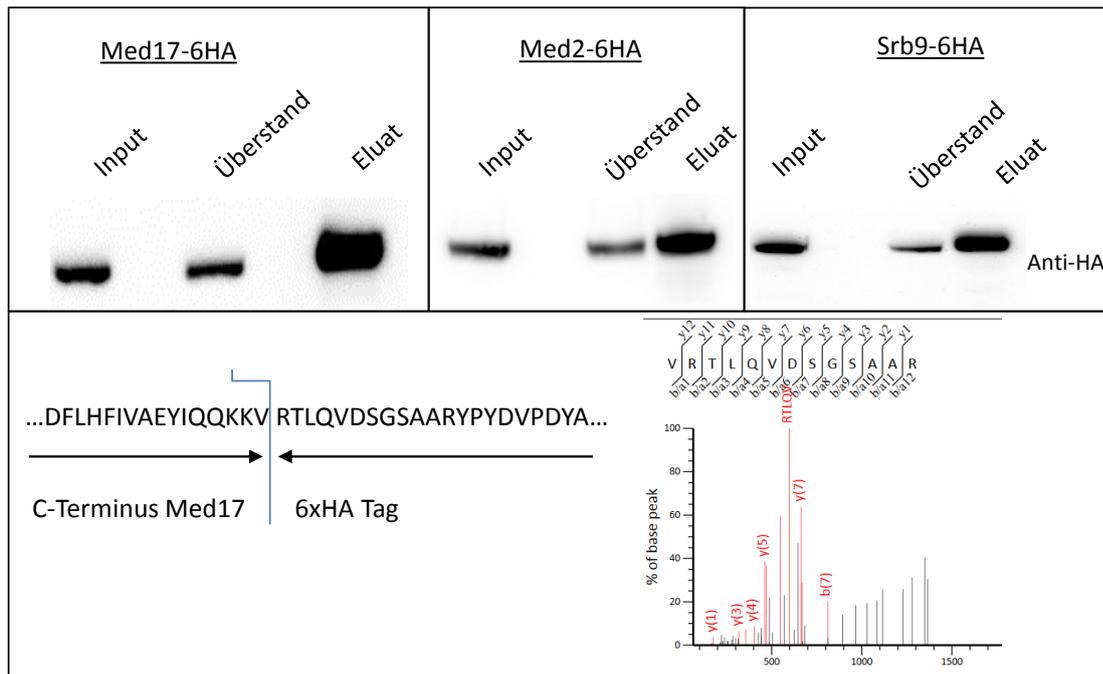


Abbildung 25 Oben: Western-Blot Analyse von Proben der Test-IPs der Stämme Med17-HA, Med2-HA und Srb9-HA. Aufgetragen sind Proben des Zelllysates vor der IP (Input) und nach der IP (Überstand) und eine Probe des Eluates. Die Detektion erfolgte über einen anti-HA Antikörper. **Unten:** Identifizierung des Übergangpeptides zwischen C-Terminus und HA-Tag zur Validierung des Fusionsproteins am Beispiel Med17-HA.

4.1.2 Optimierung der Probenvorbereitung

Nach erfolgreicher Fusion des Affinitätstags an verschiedene Untereinheiten, erfolgte die Optimierung der Proteinisolierung. Grundlage dessen war das Ziel den intakten Mediator-Komplex und interagierende Proteine so schonend wie möglich zu isolieren. Aus diesem Grund sollte der Aufschluss bei kalten Bedingungen stattfinden und so das Protokoll so kurz wie möglich gehalten werden. Die Optimierungen erfolgten an mehreren Teilprozessen, auf die nun im Folgenden eingegangen werden soll.

4.1.2.1 Stabile Isotopenmarkierung

Um große Proteinkomplexe intakt zu halten und so wenig Interaktionspartner wie möglich zu verlieren, ist es notwendig, ein sehr schonendes Protokoll mit wenig Detergenz und wenigen Waschschritten zu verwenden. Das wiederum birgt die große Gefahr, viele Proteine zu co-isolieren, die unspezifisch an die magnetischen Beads, die Antikörper oder die Gefäßwand binden. Um diese Proteine von spezifischen Interaktionspartnern des Mediators zu unterscheiden, ist die Durchführung eines parallel durchgeführten Kontrollexperimentes unumgänglich (siehe 1.1.2). Die stabile Markierung des Kontrollexperimentes mit ^{15}N Isotopen ermöglicht es, spezifische und unspezifische Interaktionspartner im Massenspektrum zu unterscheiden (Stabile Isotopenmarkierung Abschnitt 1.1.2.2). Zellen mit einem Affinitätstag am Mediator wurden in ^{14}N -haltigem Medium kultiviert und Zellen ohne Affinitätstag – die Kontrollzellen oder der Wildtyp – in ^{15}N -haltigem Medium. Ab einem bestimmten Punkt der Probenvorbereitung können die Experimente vereint und als eine Probe behandelt werden. Dies reduziert den Fehler der parallelen Bearbeitung erheblich und erhöht die Reproduzierbarkeit. Dafür muss jedoch gewährleistet sein, dass alle Proteine der Wildtyp-Hefezellen nur ^{15}N -Isotope enthalten und alle Proteine des HA-markierten Stammes nur ^{14}N -Atome. Die Zellen wurden dafür direkt von der Agarplatte in ^{14}N oder ^{15}N -SD-Minimalmedium überführt und in 2 Vorkulturpassagen bis in die stationäre Phase wachsen gelassen, bevor die Hauptkultur beimpft wurde. Die maximale optische Dichte betrug auf Grund des niedrigen Stickstoffgehaltes nie mehr als 7. In

Abbildung 26 ist die Markierungseffizienz für das Beispielpeptid IMADDYGWDVTDAR gezeigt. Mit der Software IDCalc (García Alonso et al., 2010) wurde die theoretische Isotopenverteilungen des Peptids berechnet, sollten 99% , 99.5% , 99.75% oder 100% aller Stickstoffatome durch das Isotop ^{15}N ersetzt worden sein. Die relative Abundanz der gemessenen Verteilung (Abbildung 26 links) ist mit den theoretischen Verteilungen im Balkendiagramm rechts abgebildet. Die gemessene Verteilung entspricht am ehesten einer Markierungseffizienz von 100%.

IMADDYGWDVTDAR

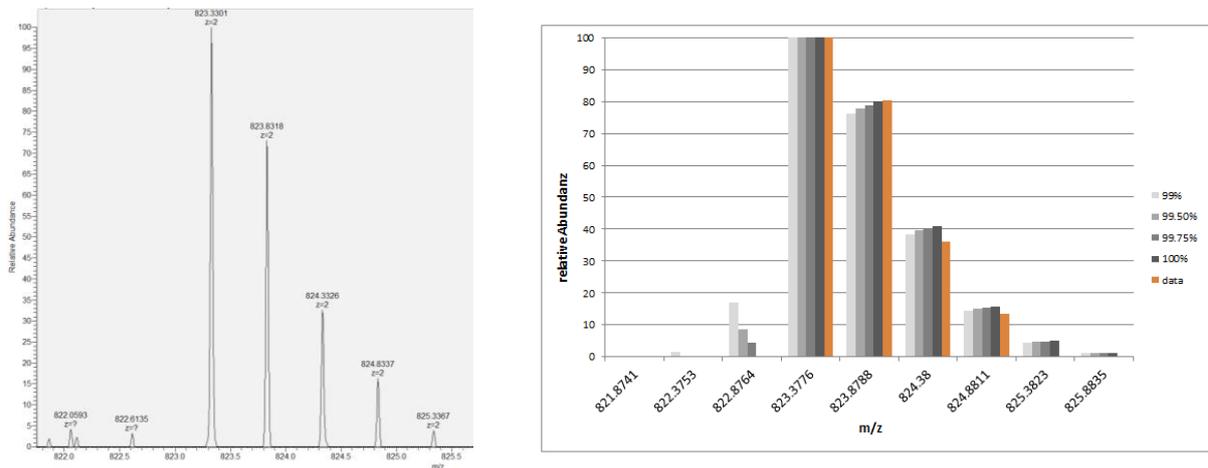


Abbildung 26 Markierungseffizienz mit ^{15}N am Beispiel des 2-fach geladenen Peptids IMADDYGWDVTDAR. Links: MS-Spektrum/ Isotopenverteilung des ^{15}N markierten Peptids (XCalibur). Rechts: Relative Abundanz der Isotopenverteilung des gemessenen Peptids (orange) im Vergleich zu den theoretischen (IDCALC) Isotopenverteilungen bei verschiedenen Werten der Markierungseffizienz (grau).

4.1.2.2 Aufschlussmethode

Der Wahl der Aufschlussmethode der Zellen bildete ein entscheidendes Problem, da die geernteten Zellen so effizient aber auch so schonend wie möglich aufgeschlossen werden sollten. Im Zuge dieser Dissertation wurden verschiedene Methoden zum Zellaufschluss ausprobiert (Methoden Abschnitt 3.2.2.4 und 3.2.2.5):

- Aufschluss in Lösung (Puffer) mit Glaskügelchen mit Hilfe eines Vortexmischers, einer Schwingmühle (MM400) oder einer FastPrep-24TM
- Zellwandverdau durch Lyticase und Zymolyase
- Kryogrinding mit Hilfe einer Schwingmühle (MM400) und einer Planetenmühle (PM100)

Als effizienteste und gleichzeitig schonendste Methode stellte sich das Zermahlen der gefrorenen Hefezellen durch eine Planetenmühle (PM100) heraus. Durch deren hohe Schlagkraft und effizientes Zermahlen konnten die Zellen bei tiefsten Temperaturen (ca. -180°C) effizient aufgeschlossen werden (Oeffinger et al., 2007). So wurden aus 1g zermahlener Hefezellen je nach Aufgabemenge (siehe Tabelle 4) 30 – 60 mg Gesamtprotein gewonnen. Gleichzeitig blieben dabei Proteinkomplexe intakt und die tiefen Temperaturen und die Abwesenheit eines Puffers während des Aufschluss verhinderten die dabei eine mögliche Dissoziation labiler Komplexe.

Mahlbechergröße	Zellen aus ___ l Kultur (OD ₆₀₀ =0.7-0.8)	Gesamtproteinmenge/ g Zellpulver
50 ml	6l	22-30 mg
	8l	40 mg
	9l	40-50 mg
125ml	12 l	63 mg

Tabelle 4 Übersicht über die Aufschlusseffizienz in Abhängigkeit von der Menge des Probenmaterials und der Größe des Mahlbechers. Die Menge des Probenmaterials beschreibt die Kulturmenge aus der Zellen mit einer OD₆₀₀=0.7-0.8 in Form von Spagetti gewonnen wurden.

Je mehr Probenmaterial für einen Mahldurchlauf genommen werden konnte, umso effizienter war auch der Aufschluss. Da für eine Immunopräzipitation jedoch 1 Gramm Zellpulver ausreichend war und die stabile Isotopenmarkierung mit ¹⁵N-Ammoniumsulfat einen erheblichen Kostenfaktor darstellte, wurden in der Regel nur Zellmengen aus 6l Flüssigkultur für einen Aufschluss verwendet. Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich, kann der Aufschluss mit dieser Aufgabemenge und dem verwendeten Mahlbecher nicht vollständig gewesen sein und einige Zellen sicherlich immer noch intakt.

Der Aufschluss mit Glaskügelchen und einer FastPrep-24™ oder einer Schwingmühle MM100 ergab höhere Gesamtproteinmengen pro Gramm eingesetztem Zellmaterial (bis zu 65mg). Aus diesen Lysaten konnten jedoch nur sehr wenige Interaktionspartner des Mediator Komplexes identifiziert werden (Anhang 3).

Ein Verdau mit dem Zellwandabbauendem Enzym Lyticase wurde nur in kleinem Maßstab getestet, eignete sich aber durch die hohen Inkubationstemperaturen (30-37°C), die lange Bearbeitungszeit und den hohen Kostenaufwand nicht für den von uns angestrebten experimentellen Aufbau.

4.1.2.3 Inkubationszeit und Waschschrte

Die ideale Inkubationszeit und die Anzahl der Waschschrte wurden empirisch ermittelt. Dabei war es wichtig ein Gleichgewicht zwischen der Effektivität der Proteinbindung und der Instabilität des Interaktoms zu finden. So erhöht eine Inkubation über Nacht den Anteil an gebundenen Proteinen zwar erheblich (Abbildung 27), könnte aber auch dazu führen, dass transient bindende Proteine sich vom Mediator lösen und nicht mehr als solche identifiziert werden können. Des Weiteren können bei einer Inkubation über Nacht auch mehr unspezifische Proteine an die Matrix der Beads binden, was zu einer Erhöhung des unspezifischen Hintergrundes führt. Die hohen Proteinkonzentrationen im Lysat (5-9 mg/ml) könnten bei einer Inkubation über Nacht auch zu einer Agglutination der Proteine führen, was das komplette Verschwinden des Signals im Western Blot (Abbildung 27) erklären würde.

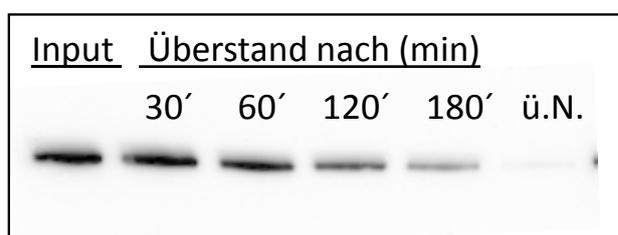


Abbildung 27 Western Blot zur Optimierung der Inkubationszeit. Aufgetragen ist das Zelllysat bevor es auf die Beads gegeben wurde (Input) und Proben des Lysates nach einer Inkubation auf magnetischen HA-Beads bei 4°C zu verschiedenen Zeitpunkten (Überstand). Angefärbt wurde der HA-Tag mittels eines anti-HA Antikörpers. Das Signal nimmt durch die Bindung des HA-fusionierten Proteins an die magnetischen Beads ab und ist nach einer Inkubation über Nacht sogar ganz verschwunden.

Um die Anzahl der nötigen Waschschrte zu bestimmen wurde nach jedem Waschschrte der Proteingehalt des entnommenen Waschpuffers mittels Bradford (Bradford, 1976) bestimmt (Tabelle 5). Dieser entsprach nach 4 Waschschrten dem reinen Waschpuffer, weshalb auf weitere Waschschrte verzichtet wurde.

Probe	Proteinkonzentration
Lysat (Med17-HA)	9,08 mg/ml \pm 0,39 mg/ml
Waschschrift 1	0,69 \pm 0,01 mg/ml
Waschschrift 2	0,12 \pm 0,01 mg/ml
Waschschrift 3	0,05 \pm 0,005 mg/ml
Waschschrift 4	0,008 \pm 0,004 mg/ml
Puffer	0,01 mg/ml

Tabelle 5 3fach Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode eines für die IP bestimmten Zelllysates (1:20 Verdünnung) und Proben der Waschlösungen (unverdünnt).

4.1.2.4 Elution

Um die gebundenen Proteine von den Antikörpern wieder zu eluieren, wurden 2 verschiedene Möglichkeiten genauer getestet: die kompetitive Elution mit HA-Peptid und die denaturierende Elution mit LDS-Probenpuffer. Die Elution mit HA-Peptide birgt den großen Vorteil, dass theoretisch nur das HA-getaggte Targetprotein und alle daran bindende Proteine durch das HA-Peptid verdrängt werden. In Abbildung 28.a ist jedoch zu erkennen, dass die Elution mit HA-Peptide auch nach 2 Wiederholungen sehr unvollständig ist und der überwiegende Anteil (95%) des mit HA-fusioniertem Zielprotein noch an die gekoppelten Antikörper bindet. Auf einem SDS-Gel aufgetragen ergab diese Art der Elution im besten Fall nur sehr schwache oder gar keine mit Coomassie färbbaren Proteinbanden (Abbildung 28.d). Entgegen der Annahme, dass diese Proteine sehr spezifisch von den Antikörpern verdrängt wurden, zeigte eine Analyse der Gels das ca. 90% der Proteine, die mit HA-Peptid von den Beads eluiert werden konnten auch im Kontrollexperiment mit Wildtyp-Zellen detektiert werden konnten (Anhang 4).

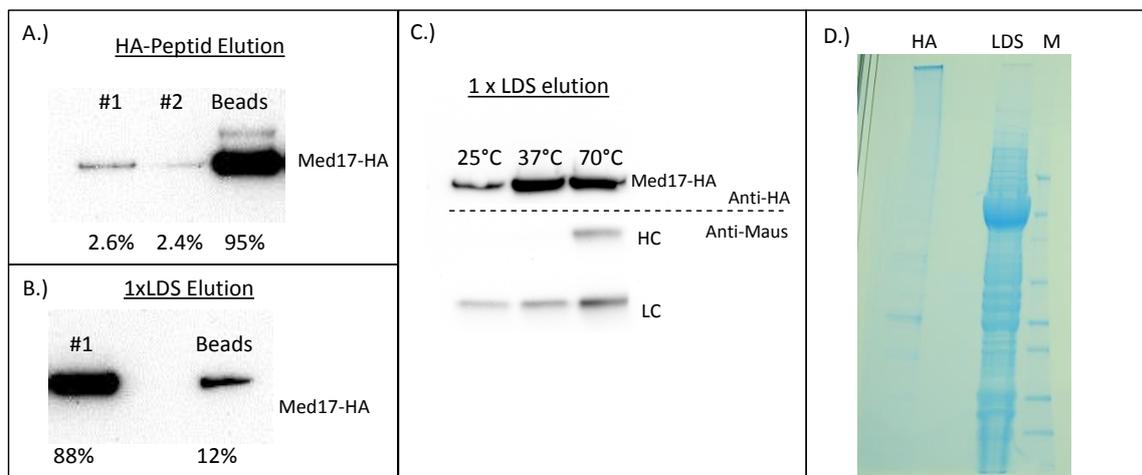


Abbildung 28 Optimierung der Elutionsbedingungen mittels Western Blot : **A.)** Elution mit HA Peptide (2mg/ml): #1-1. Elution (100 μ l), #2-2.Elution(100 μ l), Beads-Elution mit 1x LDS/RA (100 μ l), 70°C,10min **B.)** Elution mit 1-fachem LDS-Probenpuffer ohne DTT: #1- 1.Elution (100 μ l), Beads- Elution mit 1xLDS/RA 70°C,10min (100 μ l) **C.)** Elution mit 1-fachem LDS-Probenpuffer ohne DTT bei 25°C, 37°C und 70°C. Detektion oben: anti-HA Antikörper unten: anti-mouse Antikörper um die leichte und schwere Kette des anti-HA-Antikörpers (Maus) von den magnetischen Beads sichtbar zu machen. **D.)** SDS-PAGE einer HA-Peptid-Elution(HA) und einer LDS-Elution(LDS)

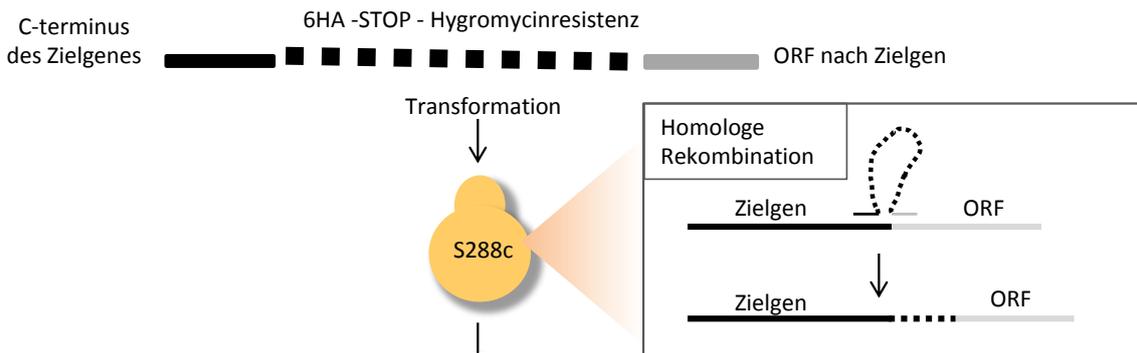
Die denaturierende Elution mit LDS Puffer löst unspezifisch alle Proteine von den Beads. In Abbildung 28 b ist zu erkennen, dass 88% des gebundenen Zielproteins durch LDS bei 37°C eluiert wird und nur 12% an den Beads verbleiben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei dieser Art der Elution auch die schwere und leichte Kette des anti-HA Antikörpers von den Beads gelöst werden und so das Eluat mit kontaminieren. Um einen Kompromiss zwischen Effektivität und dieser Kontamination zu finden, wurden verschiedene Temperaturen ausprobiert (siehe Abbildung 28.c). Die leichte Kette der

Antikörper löst sich schon teilweise bei 25°C von den Beads und die schwere Kette lässt sich bei einer Elution bei 70°C auch detektieren. Da sich ab einer Temperatur von 37°C, die Effektivität der Elution nicht mehr steigerte, wurde die Elutionstemperatur von 37°C für alle Experimente beibehalten.

4.2 Isolierung des Mediatorkomplexes und Identifizierung seiner Interaktionspartner

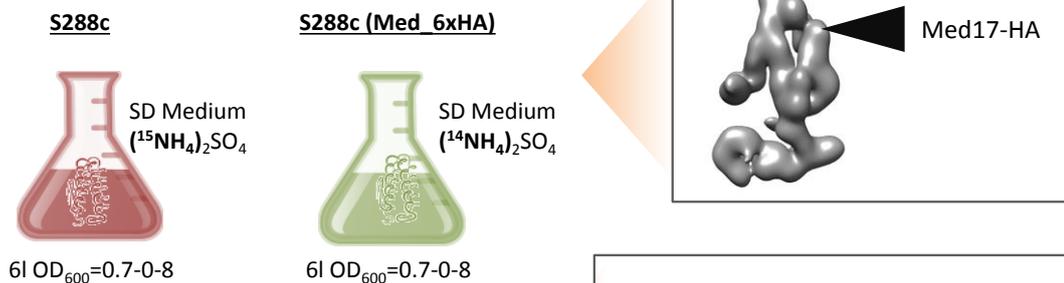
Der Mediatorkomplex besteht aus 3 Kernmodulen (Kopf, Mitte, Schwanz) und dem transient gebundenem Kinase-Module. Für ein umfassendes Bild der Interaktionen des Mediators, sollte von jedem Modul mindestens eine Untereinheit mit einem Affinitätstag versehen werden. Das im ersten Teil optimierte Protokoll zur Aufreinigung ist zusammenfassend in Abbildung 29 dargestellt und wurde für jede mit einem 6-fachen Hämagglutinin-Tag versehene Untereinheit mit jeweils 3 Replikaten durchgeführt. Um Proteine, welche spezifisch über eine Interaktion mit der getaggen Mediatoruntereinheit mit-isoliert wurden von solchen zu unterscheiden, die unspezifisch an die Antikörper oder die magnetisch Beads binden, wurde zu jeder Co-IP parallel eine Negativkontrolle mit ¹⁵N-markierten Wildtyp-Hefezellen ohne HA-Tag durchgeführt. Diese Wildtyp-Zellen wurden parallel kultiviert, geerntet und auch aufgeschlossen. Erst die Elutionen der Mediator-IP und der Kontroll-IP wurden vereint und dann als eine Probe weiterverarbeitet. Die vermischten Elutionen wurden über Nacht in Aceton gefällt und am nächsten Tag mit in LDS-Puffer aufgeköcht und dabei reduziert. Um die reduzierten Cysteinreste zu stabilisieren wurden diese mit Iodacetamid alkyliert. Die Probe wurde auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und die isolierten Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und angefärbt. Jede Lane wurde in 15 Gelstücke zerteilt und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptide wurden extrahiert und daraufhin in 15 Fraktionen im Zuge einer Flüssigchromatografie (nanoLC) nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt und mit einer Orbitrap-Fusion analysiert.

I. PCR-basiertes C-terminales Epitop Tagging



Selektion nach Hygromycinresistenz

II. Metabolische ^{15}N Markierung



III. Kryogrinding (PM100)

1g Pulver + 5ml Lysepuffer

Homogenisieren
(Douncer)

Zentrifugation

IV. Immunopräzipitation

(2h, 4°C, Rotator)

4x Waschen

Elution

III. Kryogrinding (PM100)

1g Pulver + 5ml Lysepuffer

Homogenisieren
(Douncer)

Zentrifugation

IV. Immunopräzipitation

(2h, 4°C, Rotator)

4x Waschen

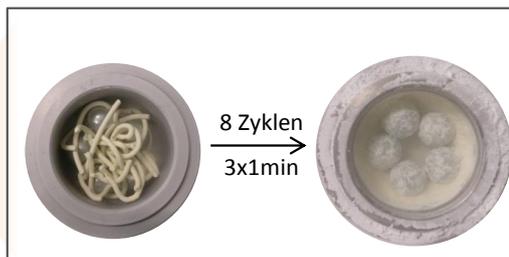
Elution

Mix

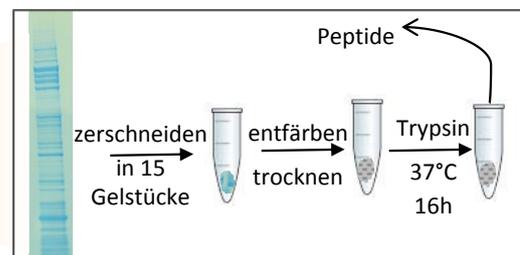
SDS-PAGE

In-Gel Verdau

MS/MS



V. MS-Probenvorbereitung



VI. Protein Quantifizierung

Abbildung 29 Zusammenfassung des etablierten und veröffentlichten (Uthe et al., 2017) Protokolls zur Isolierung des Mediator-Komplexes und interagierender Proteine aus *Saccharomyces Cerevisiae* am Beispiel der HA-getaggten Untereinheit Med17. Weiterführende Details sind im Methodenteil aufgeführt.

Die Rohdatenprozessierung und die Identifizierung der Peptide erfolgte über Mascot Distiller 2.5.1. Eine Datenbanksuche ordnete die Peptide den dazugehörigen Proteinen zu. ^{14}N - und ^{15}N -markierte Isotopologe eines Peptides wurden auf Grundlage ihrer Intensitäten quantifiziert und die Werte der

einzelnen Peptidepaare für das dazugehörige Protein zusammengefasst. Dieser Wert wird im Folgenden als H/L-Verhältnis (*Heavy/Light*) bezeichnet. In Abbildung 30 und allen weiteren Abbildungen dieser Art ist dieser Wert als Logarithmus zur Basis 2 auf der X-Achse aufgetragen. Alle Proteine, die gleichermaßen unspezifisch während der HA- und Kontroll-IP an die Antikörper oder die magnetischen Beads binden, haben ein H/L-Verhältnis nahe bei 1 (als \log_2 nahe bei 0). Proteine, die spezifisch über das HA-fusionierte Targetprotein binden, wurden mehr oder auch nur in ihrer ^{14}N -markierten Form isoliert und detektiert. Das H/L-Verhältnis verschiebt sich damit Richtung 0 und in Form des 2. Logarithmus in den negativen Bereich. Auf der Y-Achse ist die Intensität der Peptide zusammengefasst für das dazugehörige Protein als iBAQ Wert (*intensity-based absolute quantification*) als Logarithmus zur Basis 10 aufgetragen. Der iBAQ Wert normalisiert die Proteine auf Grund ihres Molekulargewichtes und der Anzahl möglicher Peptide (Hein et al., 2015; Smits et al., 2013). So werden Proteine, die auf Grund ihrer Größe nur wenig Peptide „erzeugen“ größeren aber gleich intensiven Proteinen angeglichen (siehe auch Methodenteil) Außerdem erlaubt die Verwendung des iBAQ's die Stöchiometrie von interagierenden Proteinen abzuschätzen. Untereinheiten eines Proteinkomplexes tendieren in diesen Abbildungen zur Clusterbildung (Abbildung 30). Spezifische Interaktionspartner erscheinen auf diesen Abbildungen zusammen mit der getaggten Untereinheit auf der linken Seite.

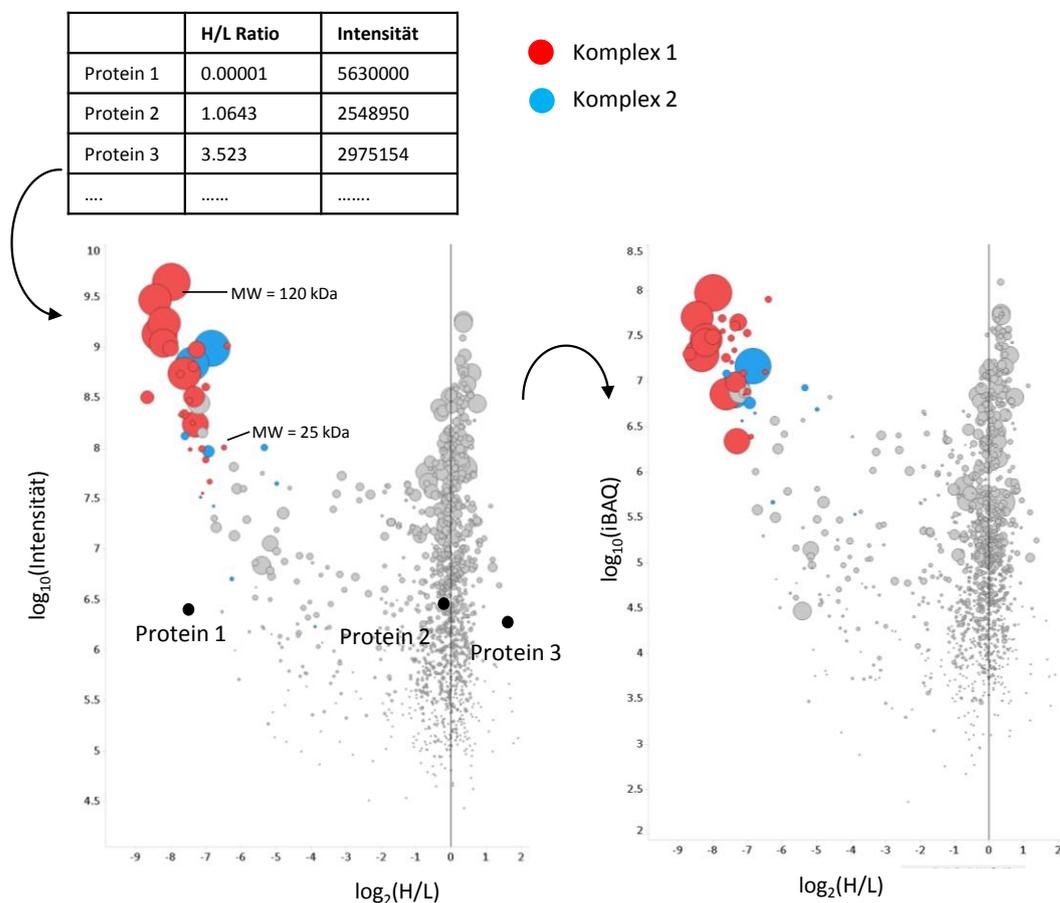


Abbildung 30 Darstellung zum besseren Verständnis der folgenden Abbildungen. Die Werte für das Verhältnis zwischen schweren und leichten Isotopologen werden auf der X-Achse im Logarithmus zur Basis 2 aufgetragen. Proteine mit einem hohen Anteil an leichten Isotopologen erscheinen dann im negativen Bereich (z.B. Protein 1). Proteine mit einem gleichen Anteil von ^{14}N und ^{15}N Varianten erscheinen nahe 0 (Protein 2). Proteine, die mit einer hohen Ratio (mehr ^{15}N Variante) erscheinen im positiven Bereich. Auf der y-Achse sind die Intensitäten der Proteine aufgetragen. Durch die Verwendung des iBAQ werden Intensitätswerte der Proteine auf Grundlage ihre Größe und theoretischen Anzahl zu erzeugender Peptide normalisiert.

4.2.1 Identifizierung des Mediator-Interaktoms über HA-fusionierte Untereinheiten des Kernmediators

Mit fünf verschiedenen Mediatoruntereinheiten die alle Module des Kernmediators repräsentieren (Abbildung 22), wurden Co-Immunopräzipitationen nach dem etablierten Protokoll als Triplikate durchgeführt. Diese Experimente sollten vorwiegend der Frage dienen, ob sich mit unterschiedlichen Untereinheiten andere Interaktionspartner isolieren lassen. Dabei konnten in jedem Triplikate insgesamt über 1300 Proteine identifiziert werden (Tabelle 6). Je nach Untereinheit binden über 1000 davon unspezifisch an die Antikörper oder an die magnetischen Beads selber. Eine große Anzahl Proteine – je nach Untereinheit 100 bis 500 – sind jedoch spezifische Interaktionspartner des Mediator-Komplexes. Diese lassen sich nochmals in 3 Kategorien aufteilen, abhängig davon in wie stark sich der Wert für das H/L Verhältnis eines Proteins von den Werten der Proteine absetzt, die um den Wert 0 streuen und davon, in wie vielen Replikaten der jeweilige Interaktionspartner als signifikant detektiert wurde. (Methodenteil 3.2.5.2). Mit den Untereinheiten Med5 und Med17 konnten über 400 Proteine als signifikant klassifiziert werden, mit der Untereinheit Med1, 2 und 19 maximal nur 152. Dabei bildeten diese Proteine nur eine Subpopulation derer, die mit Med17 und Med5 isoliert werden konnten (siehe Tabelle 6). Die Ursache dafür könnte die Position des Hämagglutinintags sein. Liegt dieser innerhalb des Komplexes nicht optimal für den Antikörper erreichbar, ist die Bindungsaffinität der Untereinheit und damit auch die Co-Isolierung anderer Proteine eingeschränkt. Aus diesem Grund wird in den folgenden Kapiteln der Schwerpunkt auf den Ergebnissen liegen, die mit der getaggen Med17 erzielt wurden. Eine Auswertung des Triplikats der Untereinheit Med5 erfolgt separat.

	Identifizierte Proteine (insgesamt)	Signifikante Interaktionspartner (insgesamt)	Signifikanzkategorie		
			I	II	III
Med17-HA	1644	467	228	167	71
Med5-HA	1654	553	96	403	54
Med2-HA	1523	152	100	32	20
Med19-HA	1369	134	89	18	27
Med1-HA	1411	109	72	21	16

Tabelle 6 Zusammenfassung aller Proteine die mit den Untereinheiten Med17, Med5, Med2, Med19 und Med1 co-isoliert werden konnten. **Unten:** Grafische Darstellung/Venn Diagramm aller als signifikant identifizierten Proteine, die sich mit denen überschneiden, die über die Untereinheit Med17 co-isoliert werden konnten.

Mit der Untereinheit Med17 konnten 467 Proteine als signifikante Interaktionspartner isoliert werden. Ein Abgleich mit der Meta-Datenbank für Protein-Protein-Interaktionen – HitPredict (López et al., 2015)- ergab, dass nur 68 dieser Proteine bisher als Kandidaten für eine Interaktion mit sicherer Datenlage (*highly confident*) gelistet sind. Eine vollständige Auflistung aller Interaktionen aller Untereinheiten des Mediators, die nicht im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, befindet sich im Anhang (Anhang 22)

4.2.1.1 Proteine des Pre-Initiationskomplexes

Mit allen HA-fusionierten Mediatoruntereinheiten konnten alle anderen 24 Untereinheiten des Mediators als Interaktionspartner der Kategorie I identifiziert werden. Die 4 Untereinheiten des Cdk8-Modules zeigten dabei in allen Experimenten signifikant niedrigere iBAQ-Werte als die Untereinheiten des Kernmoduls (Abbildung 31 und Anhang 6 bis Anhang 10). Auf der \log_{10} -Skala ist ein Unterschied vom Faktor 8 bis 10 abzulesen, was darauf schließen lässt, dass die 4 Untereinheiten des Kinasemodules nur zu etwa 10-15% am Kernmediator gebunden sind. Ob diese Beobachtung eine Folge des Zerfalls des 25 UE-Mediators während der Co-IP sind oder dies der physiologischen Stöchiometrie entspricht lässt sich an dieser Stelle noch nicht sagen. Auch alle 12 Untereinheiten der Polymerase II konnten als Interaktionspartner der Kategorie I identifiziert werden. Die iBAQ-Werte der Untereinheiten Rpb1, 2, 4 und 9 von denen bekannt ist, dass sie direkte Interaktoren des Mediators sind (Soutourina et al., 2011), liegen gleichauf mit denen des Cdk8-Modules. Das bedeutet, dass weitere 10-15% des Mediators substöchiometrisch im Komplex mit der RNA-Polymerase II und ca. 70-80% frei vorliegen. Takagi et al. publizierte 2005 ähnliche Werte für den Anteil freien Mediators (Takagi et al., 2005). Weitere Interaktionspartner mit ähnlicher Stöchiometrie sind die Transkriptionsfaktoren TFIIF (T2fa, T2fb, Taf14) und TFIIB. Mit Ausnahme von TFIIA wurden auch alle weiteren Bestandteile des Preinitiationskomplexes (TFIID, TFIIH, TBP und SAGA Komplex) mit fast allen Untereinheiten als Interaktionspartner der Kategorie I identifiziert, jedoch mit geringeren iBAQ-Werten. Weitere Interaktionspartner mit ähnlicher Stöchiometrie sind die Transkriptionsfaktoren TFIIF (T2fa, T2fb, Taf14), Sub1 und TFIIB. Wie in Tabelle 7 zu sehen ist, fehlen lediglich die Kinase Kin28 des Transkriptionsfaktors TFIH und die SAGA-Komplex Untereinheit Cdh1.

Komplex	Identifizierte Untereinheiten
TFIIB	(1/1): Tf2b
TFIID	(15/15): Taf1- Taf14 , Tbp
TFIIE	(2/2): T2ea, T2eb
TFIIF	(3/3): T2fa, T2fb, Taf14
TFIIH	(6/10): Tfb1-3, Rad3, Rad25, Ccl1
SAGA	(19/20): Taf5, 6, 9, 10, 12 , Tra1, Hfi1, Spt3,7,8,20, Gcn5, Ada2, Sgf11,29,73 , Ngg1, Ubp8, Sus1
Transkriptionsfaktoren	(19): Gcr1,2 , Gcn4, Yap1, Pdr1, Hsf1, Met4, Met32, Skn7, Fzf1, Gat1, Tye7, Asg1, Crz1 , Msn2,4, Haa1, MBF(Swi6, Mbp1)

Tabelle 7 Auflistung aller identifizierten Proteine des Pre-Initiationskomplexes, die über Med-17-HA isoliert werden konnten. Die Untereinheiten in fett können mehreren Komplexen zugeordnet werden

Der Preinitiationskomplex kann wie in Abschnitt 1.2.3.1 beschrieben, entweder mit Hilfe des SAGA Komplexes oder dem Transkriptionsfaktor TFIID ausgebildet werden. Unsere Daten lassen leider keinen Rückschluss darauf zu, welcher dieser Komplexe stärker mit dem Mediator assoziiert ist, da sich die abundantesten Untereinheiten Taf5, 6 und 12 beiden zuordnen lassen.

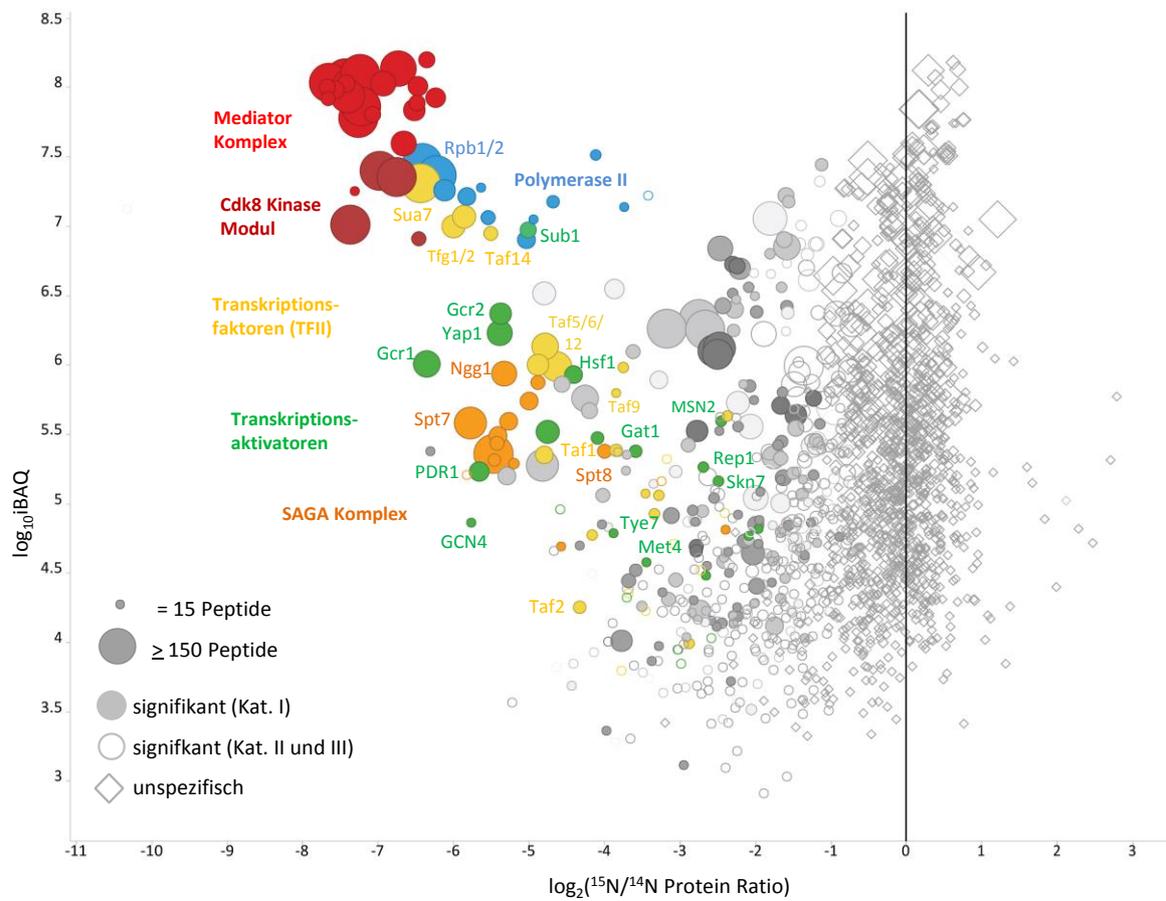


Abbildung 31 Darstellung aller Proteine die über Med17-HA (^{14}N) und eine Wildtypkontrolle (^{15}N) co-isolierten wurden. Aufgetragen ist die auf den IBAQ normalisierte Intensität gegen das Heavy/Light Verhältnis. Die Größe der Datenpunkte entspricht der Anzahl der detektierten Peptide. Die Symbole der Datenpunkte entsprechen der Signifikanz, mit der sich dieser vom unspezifischen Hintergrund abtrennt (siehe Methodenteil 3.2.5.2). Farblich hervorgehoben sind alle signifikanten Proteine die an der Initiation der Transkription beteiligt sind

Ein weiterer sehr abundanter Interaktionspartner, der auch mit allen anderen getaggeten Mediatoruntereinheiten als signifikant identifiziert werden konnte ist Sub1. Dieses DNA-Einzelstrang bindende Protein ist an verschiedene Stadien der Transkription beteiligt ist. Es interagiert während der Initiation sowohl mit dem Transkriptionsfaktor TFIIIB, als auch während der Elongation mit der Kinase Kin28 und der CTD-Phosphatase Fcp1. Des Weiteren konnte Sub1 schon mit Pol III Genen assoziiert detektiert werden (Rosonina et al., 2009). Für eine recht universale Rolle in der Transkription spricht außerdem die Entdeckung, dass Sub1 innerhalb der Transkriptionsblase an den non-template Strang der DNA bindet (Sikorski et al., 2011). Durch die sehr ähnliche Stöchiometrie zum Mediator Komplex, ist anzunehmen, dass entweder eine direkt oder sehr nahe Interaktion zum Mediator besteht.

Weitere Interaktionspartner der Kategorie I und II sind 18 verschiedene Transkriptionsaktivatoren. Darunter finden sich Transkriptionsfaktoren von denen eine Interaktion schon bekannt ist, wie z.B Yap1, Pdr1 und Gcn4 (Natarajan et al., 1999; Thakur et al., 2008) aber auch unbeschriebene wie z.B die Aktivatoren Gcr1 und Gcr2, welche für die Regulation der Expression glykolytischer und ribosomaler Gene verantwortlich sind. Interessanterweise wurde bei Chip-Experimenten eine Interaktion des Mediators mit solchen Genen bisher nicht beobachtet (Fan et al., 2006; Paul et al., 2015). Weitere co-isolierte Transkriptionsfaktoren sind die auf oxidativen Zellstress reagierenden Aktivatoren Msn2, Msn4, Skn7 und Hsf1. Auch der Zellzyklus-abhängige Transkriptionsfaktor MBF (*MCB-binding factor*) bestehend aus den Untereinheiten Swi6 und MBP1 erscheint in dieser Liste. In diesem Zusammenhang lässt sich auch das peroxisomale Membranprotein Pex19 nennen, da es schon 2006 von Titz et al. als

starker Transkriptionsfaktor beschrieben wurde (Titz et al., 2006). Eine Co-IP mit HA-fusioniertem Pex19 (inkl. ^{15}N Wt-Kontrolle) zeigte zudem eine spezifische Anreicherung von 4 Untereinheiten des Mediatorkernkomplexes (siehe Anhang 10).

4.2.1.2 Proteine der Transkriptionselongation und mRNA-Prozessierung

Neben diesen Proteinen, die alle im engen Zusammenhang mit der klassischen Funktion des Mediators als Cofaktor der Transkriptionsinitiierung stehen, finden sich jedoch auch viele co-präzipitierte Proteine, die in die Elongation und mRNA-Prozessierung involviert sind. TFII-S (Dst1) beispielsweise ist ein wichtiger Elongationsfaktor, der die endonukleolytische Spaltung entstehender mRNA durch die Polymerase II stimuliert und somit den Elongationskomplex reaktivieren kann (Wind and Reines, 2000). Da TFII-S jedoch genauso eine Rolle bei der Initiation spielt (Guglielmi et al., 2007), lässt sich nicht unterscheiden, in welcher Funktion er in diesem Experiment isoliert wurde. Wie schon zuvor beschrieben, besteht ein wesentlicher Vorgang bei der Elongation darin, die Interaktion zwischen Nukleosomen und DNA soweit zu lockern, dass die Polymerase II nicht an der Transkription gehindert wird. Eine wichtige Rolle spielt dabei der FACT Komplex. Dieser besteht aus dem Histonchaperon Spt6 und Pob3, welche beide als signifikante Interaktionspartner isoliert werden konnten. Weitere signifikante Interaktionspartner die an der Elongation beteiligt sind, sind das Polyadenin-bindende Protein Pab1 und Brr2 und Cbp2, beide involviert in den Prozess des Spleißens. In der Liste der signifikanten Interaktionspartner (Tabelle 8) sind auch Proteine zu finden, die für den Abbau von mRNA verantwortlich sind, wie beispielsweise die Enzyme, die die 5'-Kappe entfernen (Dcp2, Edc3) und die Exonuklease Xrn1. Interessanterweise sind auch einige Untereinheiten der Translations-Initiationsfaktoren eIF4G (TIF4631 und TIF4632), eIF3 und eIF2a signifikante Interaktionspartner der Mediatoruntereinheit Med17. Dabei bindet eIF4G jedoch im Zytoplasma an den cytoplasmatischen Cap-Binding Komplex (CBC) und leitet die Translation ein (Gingras et al., 1999). Die Untereinheiten des nuclearen Cap-Binding-Komplexes (CBC) Sto1 und CBC2, welche als Interaktionspartner im Kontext der Elongation mehr Sinn machen würden, weil sie noch im Kernplasma an die die Cap-Struktur binden (Görlich et al., 1996), lassen sich jedoch nicht identifizieren. Des Weiteren konnten einige Nucleoporine als signifikante Interaktionspartner identifiziert werden (Abbildung 32). Nucleoporine bilden den Kernporenkomplex aus und stehen mit der Transkription in engem Zusammenhang. Neben ihrer Funktion als Schleuse für mRNA in das Cytoplasma interagieren sie auch direkt mit dem Genom und beeinflussen die Transkription (Ibarra and Hetzer, 2015). Schneider et al. veröffentlichte zudem eine Interaktion des Mediatorkomplex mit der Kernpore über den ebenfalls an der Kernpore lokalisierten TREX Komplex (Schneider et al., 2015). Untereinheiten des TREX-Komplexes konnten in den vorliegenden Daten jedoch nicht identifiziert werden.

Komplex /Funktion	Proteine
FACT Komplex	(2/2) Spt16, Pob3
CCR4-Not Komplex	(5/9): CCR4, Mot2, Not3, VTS1, Pop2
	Spt6
	Tfs2, Pabp, Gfd2
Splicing	Brr2, Cbp2
mRNA Abbau	Xrn1, Nmd2, Decapping: Dcp2 und Edc3
Nucleoporine	Seh1, Nup159, Nic96, Nup133, Nup116
Translationsinitiation	Clu1 (eIF3), Gcd2,6 (eIF-2B), Tif4631, Tif4632 (eIF4), Bud27, Sbp1,

Tabelle 8 Auflistung aller identifizierten Proteine die in die Transkriptionselongation, der mRNA-Prozessierung, dem mRNA-Transport und der Initiation der Translation beteiligt sind.

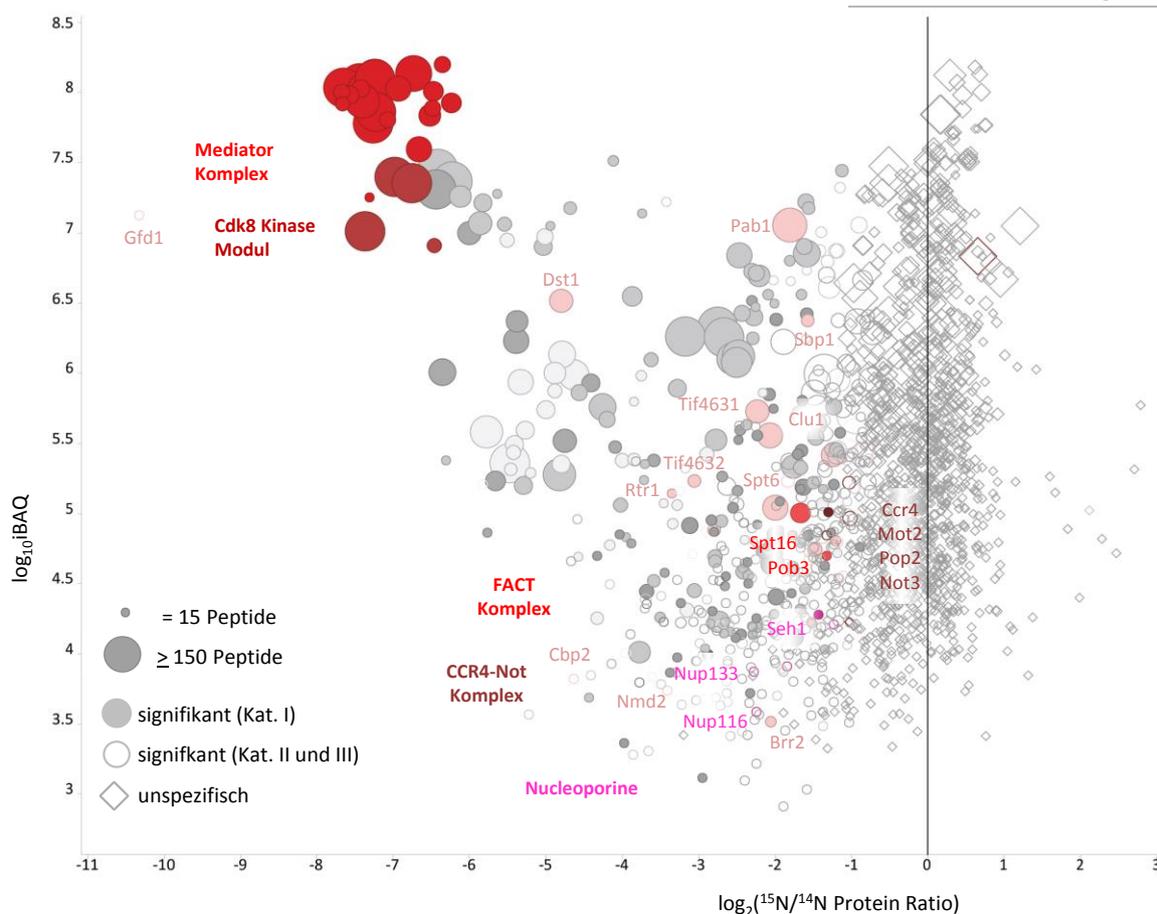


Abbildung 32 Darstellung aller Proteine die über Med17-HA (^{14}N) und eine Wildtypkontrolle (^{15}N) co-isolierten wurden. Farblich hervorgehoben sind alle signifikanten Proteine die an der Elongation, der mRNA Prozessierung, dem mRNA-Transport und der Initiation der Translation beteiligt sind.

4.2.1.3 Histone und *Chromatin Remodeling* Komplexe

Die Umstrukturierung des Chromatins ist eng mit der Initiation und Elongation der Transkription verbunden und muss im Zusammenspiel gut koordiniert werden. Dass der Mediator für die Rekrutierung Chromatin remodulierender Komplexe im besonderen des Swi/Snf Komplexes an manchen Genen verantwortlich ist, konnte von Ansari et al am *CHA1* Gen gezeigt werden (Ansari et al., 2014). Einige Untereinheiten des Swi/Snf Komplexes wurden auch schon über den Mediatorkomplex co-isoliert (Wilson et al., 1996). Unsere Daten zeigen (Abbildung 33), dass fast alle Untereinheiten des Swi/Snf Komplexes als signifikante Interaktionspartner klassifiziert werden konnten. Des Weiteren finden sich auch viele Untereinheiten des RSC-Komplexes. Signifikant aber dennoch viel weniger intensiv konnten auch Untereinheiten des Swr1-, Isw1, Isw2, Ino80 und des NuA4-Komplexes co-isoliert werden (siehe Tabelle 9).

	Med17
SWI/SNF Komplex	(10/11): Swi1,2, Snf2,5,6,12, Arp7,9 , Swp82, Taf14
RSC Komplex	(12/17): Rsc2,3,4,6,7,8,9,30, Sth1, Rtt102, Arp7,9
Swr1 Komplex	(3/16): Swc4 , Bdf1, Arp4
Ino80 Komplex	(4/15): Ino80, Ies1, Arp4 , Taf14
ISW1b Komplex	(2/3): Isw1, loc2
ISW2 Komplex	(1/2): Isw2

NuA4 Histon Acetyltransferase Komplex

(5/13): Epl1, Eaf1,3 Act1, Swc4

Tabelle 9 Übersicht über die mit Med17-HA co-isolierten Untereinheiten von Komplexen des Chromatin-Remodelings. Alle aufgelisteten Proteine konnten mindestens der Signifikanzkategorie III zugeordnet werden. Alle Proteine in Fett können mehreren Komplexen zugeordnet werden.

In Abbildung 33 ist zudem zu erkennen, dass auch die Bestandteile des Nukleosomes selbst, die Histone spezifisch mit dem Mediator Komplex interagieren. Die N-Termini dieser Histone weisen zudem eine starke Acetylierung auf und eine einfache, zweifache und sogar dreifache Methylierung an den Positionen H3K36 und H3K79 auf(Abbildung 34), was eine typische Modifikation für Histone darstellt, die an transkriptional aktiver DNA assoziiert sind. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass eine Acetylierung im Besonderen des Histons 4 (H4K16) die Interaktion zwischen Histon und Mediator stört (Zhu et al., 2011a) Mit der Mediatoruntereinheit Med17 konnte zudem auch die Variante H2A.Z identifiziert werden. Diese Variante wird häufig in Nukleosomen an Promotorregionen gefunden.

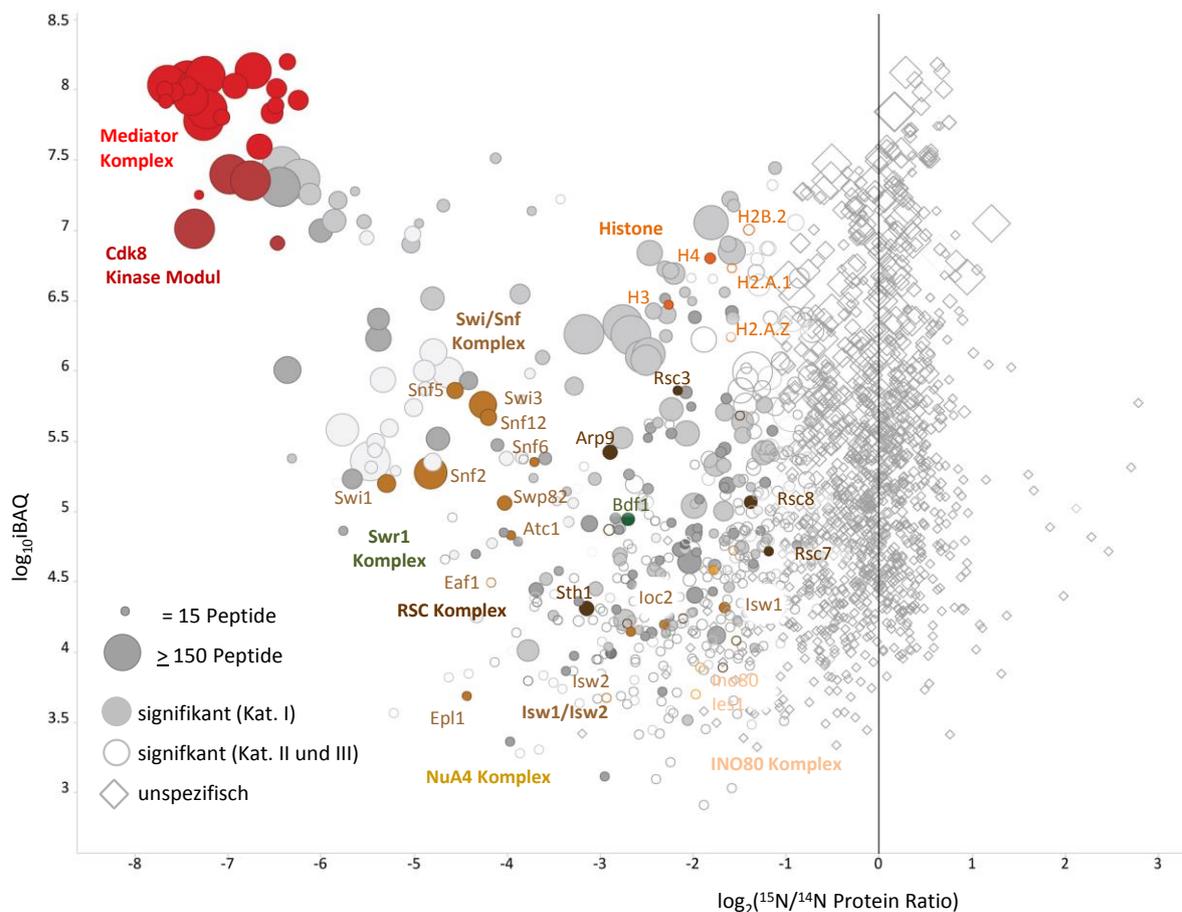
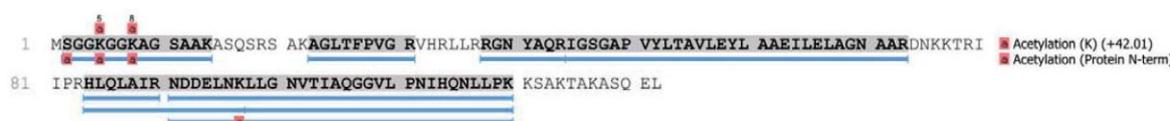


Abbildung 33 Darstellung aller Proteine die über Med17-HA (^{14}N) und eine Wildtypkontrolle (^{15}N) co-isolierten wurden. Farblich hervorgehoben sind alle signifikanten Proteine die an der Remodulierung des Chromatins beteiligt sind oder Bestandteil dessen.

Histone H2A1



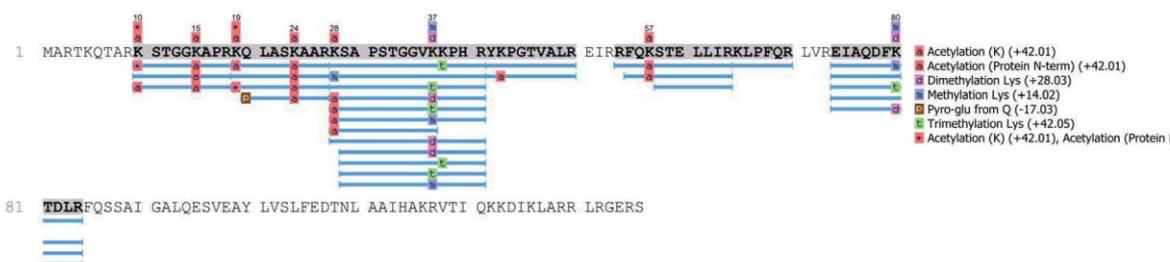
Histone H2A.Z



Histone H2B1



Histone H3



Histone H4

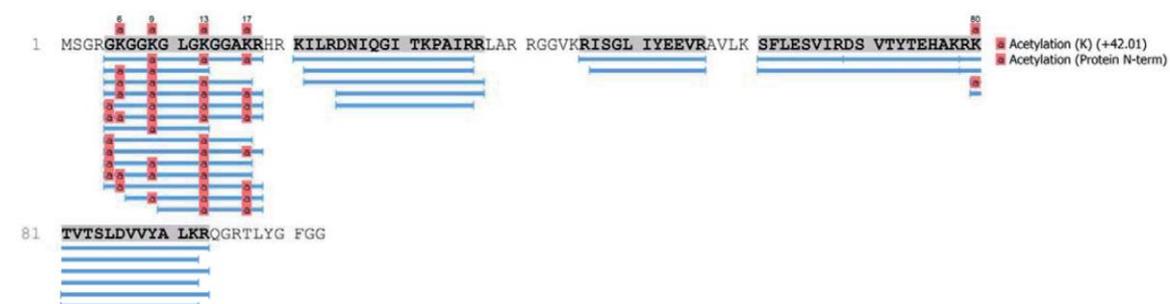


Abbildung 34 Sequenzabdeckung der als spezifische Interaktionspartner identifizierten Histone H2A, H2A.Z, H2B, H3 und H4. Alle Histone sind an ihren N-Termini stark acetyliert. Histone 3 zeigt zudem auch dreifache Methylierungen am K37 (Datenbanksuche und Erstellung der Abbildung durch PEAKS 7.5)

4.2.1.4 Polymerase I, Proteine der rRNA Synthese und Ribosomen Biogenese

Neben der Polymerase II konnten alle 14 Untereinheiten der RNA-Polymerase I als Interaktionspartner der Kategorie I identifiziert werden. Die Stöchiometrie der Interaktion ist dabei um mehrere

Größenordnungen (ca. 100fach) geringer als die Interaktion mit der Polymerase II. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine solche Interaktion in Reis. In einer Publikation von Li et al. (Li et al., 2015) konnte in einem *Yeast two-hybrid* Assay gezeigt werden, dass die Polymerase I Untereinheit SAD1 (RPA34.5) mit dem Mittelmodule über Med4 interagiert. Weitere Hinweise auf eine direkte oder genetische Interaktion finden sich jedoch bisher nicht in der Literatur. Für die Polymerase I spezifische Initiationsfaktoren sind der *upstream activating factor* (UAF), Rrn3, das TATA-Box bindende Protein (TPB) und der *core factor* (CF). Mit Ausnahmen der UAF Untereinheit Rrn5, welcher nur mit sehr geringer Intensität detektiert werden konnte und dem TBP, lässt sich jedoch keiner dieser Komplexe als Interaktionspartner des Mediators identifizieren. Dafür finden sich überraschend viele Proteine, die direkt mit der Polymerase I interagieren. So konnte beispielsweise alle Proteine des RENT Komplexes und das *high-mobility group* Protein Hmo1 mit hoher Signifikanz und Intensität identifiziert werden. Net1 ist das zentrale Protein des sogenannten RENT Komplexes (*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*), welcher sich außerdem noch aus der Histon-Deacetylase Sir2 und der Proteinphosphatase Cdc14 zusammensetzt und für die Stilllegung von rDNA Bereichen verantwortlich ist (Straight et al., 1999). Unabhängig von diesem Komplex kann Net1 aber auch direkt mit der Polymerase I interagieren und stimuliert die rRNA synthese *in vivo* und *in vitro* (Shou et al., 2001). Hmo1 bindet dagegen findet man vor allem an transkriptional hoch aktiver rDNA und ist ein Bestandteil des Pol I Transkriptionsapparates (Gadal et al., 2002). Hmo1 und Net1 weisen außerdem eine ähnliche Stöchiometrie wie die Polymerase I selber, was dafürspricht, dass zumindest die Untereinheiten RPA1 und RPA2 zusammen mit Net1 und Hmo1 an den Mediator binden. Weiterhin konnten mehr als 35 Proteine signifikant co-isoliert werden, die an der Synthese (Dpo5) und Prozessierung der rRNA (Nop2, Nop4, Pwp1) und der ribosomalen Biogenese (Kre33, Mdn1, Nop13, Dbp10, Rrp12) beteiligt sind. Mit den Untereinheiten Med2, Med1 und Med19 konnte die Polymerase I nur als hoch abundantes Protein im Hintergrund detektiert werden und wurde nicht durch eine stabile Interaktion mit dem Mediator angereichert (siehe Anhang 8 bis Anhang 10)

Komplex /Funktion	
Polymerase I	(12/12): Rpa1, 2, 12, 14, 34, 43, 49, Rpab1-5, Rpac1-2
UAF	(1/6): Rrn5
Elongation	RENT Komplex (3/3): Net1, Cdc14, Sir2 Hmo1
U3 small subunit processome	Utp8,10, 20, 22
rRNA Synthese und Prozessierung	PolV, Rrp12, Mak5, Rix1, Mdn1, Dbp7, Dbp10, Drs1, Enp1, Noc3, Nop2,4,13,14 , Pwp1, Pno1, Tof2
Ribosomen Biogenese	Rrp5, Loc1, Rpf2, Mak21, Nip7, Kre33, Nog1
Polymerase III	(9/17): Rpc1,2, Rpac1,2 , Rpab1-5
Initiation	TFIIIB (2/3): Tf3b, Tbp TFIIIC(2/6): Tfc1,3

Tabelle 10 Übersicht über die mit Med17-HA co-isolierten Untereinheiten der Polymerase I und III und Proteine die an der Transkriptionsinitiation der Polymerase I und III, der rRNA-Prozessierung und Ribosomen Biogenese beteiligt sind Alle aufgelisteten Proteine konnten mindestens der Signifikanzkategorie III zugeordnet werden. Alle Proteine in Fett können mehreren Komplexen zugeordnet werden

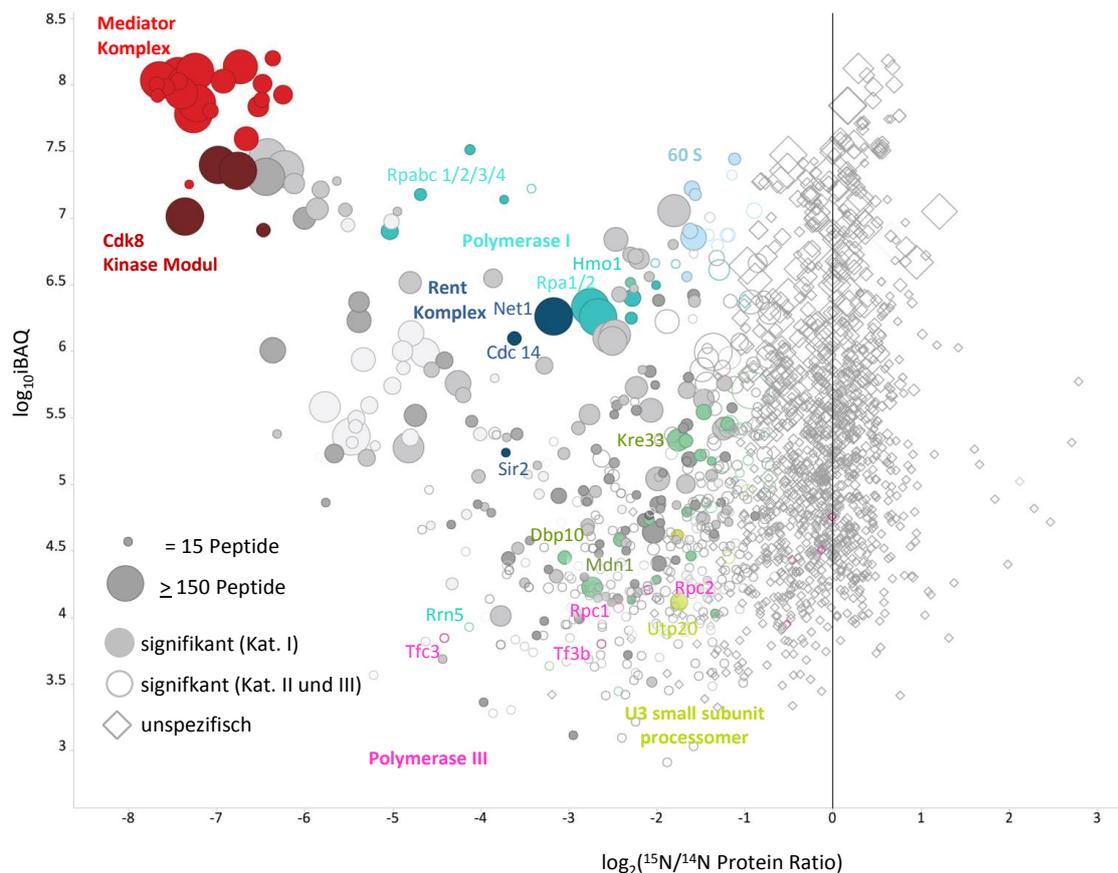


Abbildung 35 Darstellung aller Proteine die über Med17-HA (^{14}N) und eine Wildtypkontrolle (^{15}N) co-isoliert wurden. Farblich hervorgehoben sind Untereinheiten der Polymerase I und III und Proteine die an der Transkriptionsinitiation der Polymerase I und III, der rRNA-Prozessierung und Ribosomenbiogenese beteiligt sind.

4.2.1.5 Polymerase III

Auch die zwei größten Untereinheiten der RNA-Polymerase III (Rpc1 und Rpc2) konnten über die Untereinheit Med17 als spezifische Interaktionspartner isoliert werden (Abbildung 35). Im Gegensatz zur Polymerase I gelang die Co-Immunopräzipitation der Rpc1 auch mit den Untereinheiten Med1, Med5 und Med19. Weiterhin konnten 2 Untereinheiten des Transkriptionsinitiationsfaktors TFIIC als signifikant identifiziert werden. Die Polymerase III ist neben der Transkription der 5.8S rRNA auch für die Transkription der tRNA verantwortlich. In Spaltheft konnte ein Zusammenhang zwischen tRNA Transkription und Med20 hergestellt werden. Eine Deletion der Untereinheit Med20 führt zu einem dramatischem Anstieg von adenylierter tRNA und snoRNA (Carlsten et al., 2016). Die Autoren betonen, dass es sich dabei um eine Interaktion zwischen Mediator und den Pol III Untereinheiten RPC53/C37 handeln könnte, ganz ähnlich der Interaktion zwischen Mediator und TFIIF. Im Zuge dieser Arbeit konnten jedoch die Untereinheiten RPC53 und RPC37 nicht identifiziert werden. Weitere Hinweise auf eine Interaktion des Mediators mit der Polymerase III, ist die Anwesenheit von Med2 im Bereich von tRNA transkribierender Genen (Paul et al., 2015).

4.2.1.6 Retrotransponale Elemente TY1 und Ty2

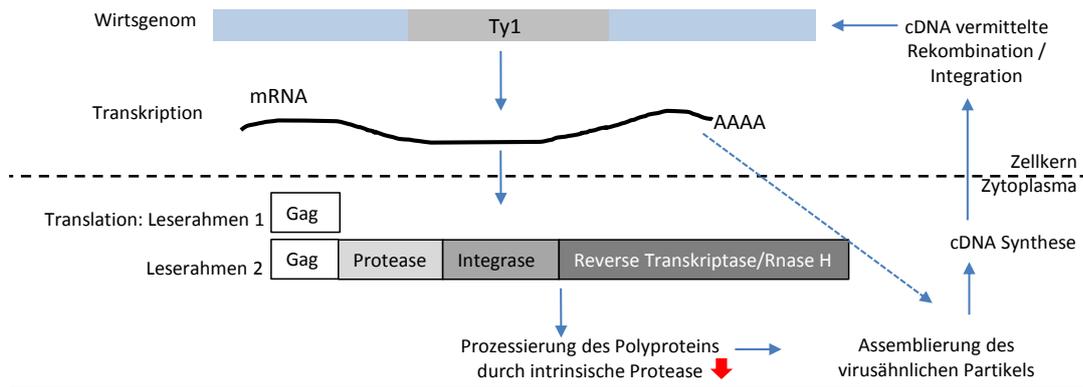
Ty Retrotransposons gehören zu den virusähnlichen, genetisch mobilen Elementen, die einen ganz ähnlichen Lebenszyklus wie Retroviren aufweisen, mit der Ausnahme, dass sie keine extrazelluläre und somit infektiöse Phase aufweisen (siehe Abbildung 36). Im gesamten Hefegenom machen Transposons 3.1% aus (Kim et al., 1998a). Mit allen getaggten Untereinheiten konnten insgesamt 11 Ty1 und 3 Ty2 retrotransponale Elemente als signifikante Interaktionspartner identifiziert werden, die meisten wiederum mit den Untereinheiten Med17 und Med5. Ty1 und Ty2 Transposons zeichnen sich durch

eine sehr hohe Ähnlichkeit (90%) in der Proteinsequenz aus, was eine eindeutige Zuordnung der Peptide zu dem jeweiligen Transposon sehr ungenau macht. Die Sequenzabdeckung am Beispiel des TY1 Transposon Ty1-B (Abbildung 36) zeigt, dass Peptide aus dem gesamten Polyprotein detektiert wurden, wobei die meisten und intensivsten Peptide aus dem Bereich stammen, der das Kapsidprotein und die Protease umfasst. Außerdem finden sich auch Peptide die die Schnittstelle der Protease überspannen. Eine Interaktion zwischen dem Mediatorkomplex und einem oder mehreren Transposons müsste demnach auch über das unprozessierte Polyprotein erfolgen.

Komplex /Funktion	
Retrotransponale Elemente	Ty1A-OL,-NL2, Ty1B-Gr1,-OL,-Er2,-BL, Ty2B-C, -LR1
Inosin-5' monodehydrogenase	IMD1, 2, 3, 4
Karyopherine	Srp1, Kap95, 123, Smx1, Pse1, Crm1, Msn5
T-Komplex	Cct3, 6, 7
Serin/Threonin Proteinkinasen	Gin4, Kin4, Ksp1, Kic1
DNA-Reparatur/Replikation	Replikation: Rfc1, Top2, Fob1, Mrc1, Mcm2, Pol2, Cdc9 DNA-Reparatur: Rad59, MSH2, Pol2, Sen1 Cbf2 Telomere: Rif, Tel2, Gbp2, Mtc1

Tabelle 11 Übersicht über die mit Med17-HA co-isolierten Karyopherine, retrotransponale Elemente, Untereinheiten des T-Komplexes, Proteinkinasen und Proteine die an der DNA-Replikation und Reparatur beteiligt sind.

A.) Lebenszyklus retrotransponaler Elemente



B.) Sequenzabdeckung Ty1B

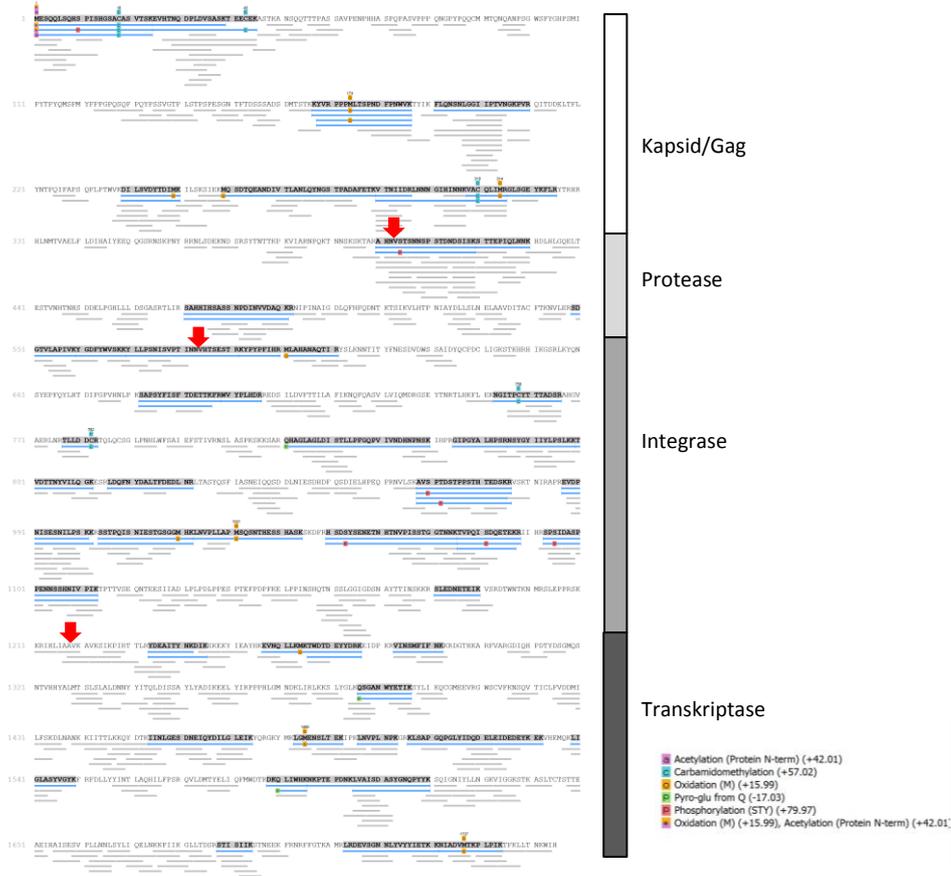


Abbildung 36 A.) Der Lebenszyklus eines Ty Retrotransposons: Das transponale Element ist im Wirtsgenom integriert, die Transkription erfolgt durch die RNA-Polymerase II. Das Transkript wird wie jede andere mRNA polyadenyliert, mit einer 5'-Cap versehen und in das Cytoplasma transportiert. Dort findet die Translation zum Polyprotein statt. Je nach verwendetem Leseraster besteht dieses in seiner kurzen Version nur aus dem Kapsidprotein (Gag – Protein) oder in seiner langen aus einem Polyprotein, welches das Kapsidprotein, eine Integrase, eine Protease und eine reversen Transkriptase beinhaltet (Pol-Proteine). Durch die intrinsische Protease kann dieses Polyprotein zu den einzelnen Virusproteinen reifen und sich ein virusähnlicher Partikel assembliert. In diesem findet die cDNA Synthese der mRNA statt (Lesage and Todeschini, 2005) **B.)** Sequenzabdeckung des Ty1-Polyproteins TY1B isoliert mit der Mediatoruntereinheit Med17 (Abbildung erstellt mit Peaks (Version 7.5)). Die roten Pfeile symbolisieren die Schnittstelle der intrinsischen Protease.

4.2.1.7 Inosin-5'-Monophosphatdehydrogenase

Ein weiterer hoch abundanter Proteinkomplex, der mit 4 Mediatoruntereinheiten als spezifischer Interaktionspartner isoliert werden konnte, ist die Inosin-5'-Monophosphatdehydrogenase (IMDH).

Alle 4 Isoformen (IMDH1, 2, 3 und 4) interagieren signifikant mit dem Mediatorkomplex (Abbildung 37). Dieses zytosolische Protein, mit Funktion in der *de novo* GTP-Synthese lässt sich zunächst nicht in einen funktionalen Zusammenhang mit der Transkription bringen. Dieser Proteinkomplex könnte jedoch eine wenig bekannte Funktion im Zellkern besitzen. Im Zuge eines genomweiten Screenings nach Proteinkomplexen wurde gezeigt, dass IMD2 und IMD3 im Komplex mit 6 Mediatoruntereinheiten, dem Transkriptionsfaktor TFIID und der Polymerase I-Untereinheit RPA135 und 10 Untereinheiten der RNA-Polymerase III vorliegt (Gavin et al., 2006). Alle 4 Isoformen lassen sich auch spezifisch im Rahmen einer IP mit Hämagglutinin-fusioniertem RPA49 und RPA135 anreichern (Daten im Anhang 14). Des Weiteren ist bekannt das alle Isoformen eine Subdomäne besitzen, die sowohl DNA als auch RNA in vivo und in vitro binden kann (McLean et al., 2004). In menschlichen Zellen wurde IMD1 im Zellkern lokalisiert und für *Saccharomyces cerevisiae* sogar schon gezeigt, dass es dort an Telomerstrukturen bindet (Cornuel et al., 2002). Da die 4 Isoformen der IMDH teilweise nahezu identische Proteinsequenzen haben, ist eine genaue Zuordnung der Peptide wieder sehr ungenau und es kann keine Aussage darüber getroffen werden, in welcher Stöchiometrie die 4 Isoformen wirklich mit dem Mediator interagieren.

4.2.1.8 Proteine der DNA-Reparatur und Replikation

Eyboulet et al. veröffentlichten 2013 einen Zusammenhang zwischen der Transkriptions-gekoppelten DNA Reparatur und dem Mediatorkomplex (Eyboulet et al., 2013). Dabei identifizierten sie eine Interaktion zwischen der Nuklease Rad2 und der Untereinheit Med17. In unseren Daten konnte dieses Protein nicht als Interaktionspartner identifiziert werden, dafür aber Rad59, Msh2 und die Helicase Sen1, welche alle an verschiedenen Reparaturmechanismen beteiligt sind.

Außerdem sind einige der co-isolierten Proteine in den Prozess der Replikation involviert. So konnte DNA-Ligase Cdc9 konnte als signifikanter Interaktionspartner ermittelt werden, sowie die Topoisomerase Top2, der Mrc1 (*mediator of replication checkpoint protein 1*) und der Replikationsfaktor Rfc1. Mit Ausnahme der Interaktion zwischen Mediator und dem Cohesinkomplex (Cena et al., 2013; Kagey et al., 2010) wurde ein funktioneller Zusammenhang zwischen Mediatorkomplex und der Replikation bisher nicht publiziert.

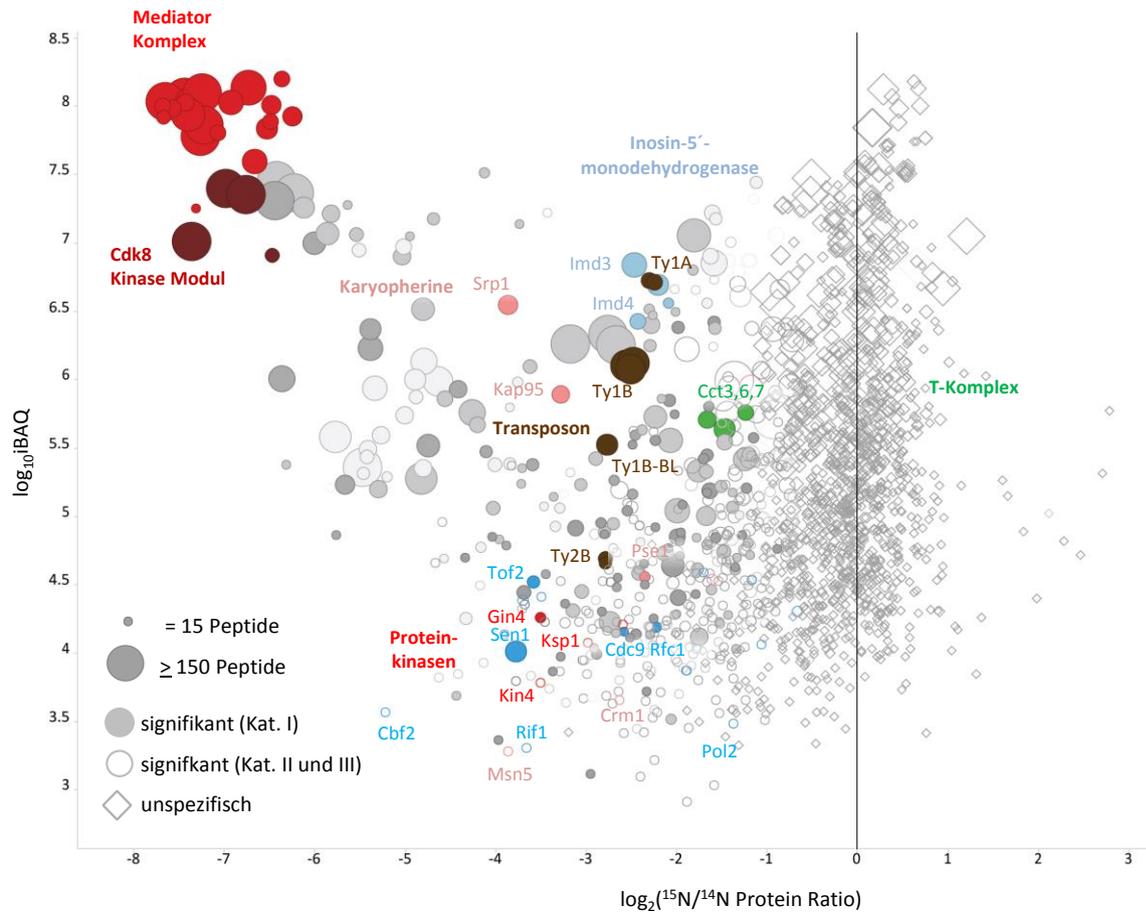


Abbildung 37 Darstellung aller Proteine die über Med17-HA (^{14}N) und eine Wildtypkontrolle (^{15}N) co-isoliert wurden. Farblich hervorgehoben sind Karyopherine, retrotransponale Elemente, der T-Komplex, Proteinkinasen und Proteine die an der DNA-Replikation und Reparatur beteiligt sind.

4.2.1.9 Interaktom der Untereinheit Med5

Vor allem mit Med5 lassen sich viele mitochondriale Proteine identifizieren, die anscheinend mit Med5 interagieren. Dies kann unter Umständen daran liegen, dass durch das anfügen eines HA-Tags an Med5 seine Funktionsweise beeinflusst wurde. Béve et al. hat gezeigt, dass in synthetischem Minimalmedium die Deletion von Med5 dramatische Effekt auf die Expression von kernkodierten mitochondrialen Proteinen hat (Béve et al., 2005). Vielleicht werden bestimmte mitochondriale Proteine bei Med5-HA vermehrt exprimiert als im Wildtyp und erscheinen deshalb auf der spezifischen Seite. Kann sein, dass man für Med14-HA und Med16HA dieselben Effekte sehen würde.

4.2.2 Interaktionspartner des Cdk8-Mediators

Mit den getaggtten Untereinheiten des Mediator-Kernmoduls lassen sich Proteine isolieren, die mit dem Mediator in Ab- und Anwesenheit des Kinasemoduls interagieren. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse sind demnach eine Mischung aus Interaktionspartnern, die sowohl zum Interaktom des 21-Untereinheiten(UE)-Mediator als auch zum Interaktom des 25-UE-Mediator inklusive dem Cdk8-Modul gehören. Um einen Überblick darüber zu erhalten, welche Proteine sich nur in Anwesenheit des Kinasemoduls isolieren lassen, wurde die Untereinheit Srb9/Med13 mit Hämagglutinin fusioniert und 3 Replikate einer Co-IP unter denselben Bedingungen wie für die Untereinheiten des Kernmoduls angefertigt. Wie in Abbildung 38 zu erkennen ist, beschränkt sich die Anzahl der Interaktionspartner im Wesentlichen auf die anderen 21 Mediator-Untereinheiten, 6 Transkriptionsaktivatoren und ein paar Untereinheiten des SAGA- und SWI/SNF Chromatin Remodeling Komplexes. Weder Untereinheiten der

3 RNA- Polymerasen noch allgemeine Transkriptionsfaktoren interagieren mit dem Mediatorkomplex, wenn das Cdk8-Modul daran assoziiert ist. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen überein, dass der Mediatorkomplex mit dem Kinasemodul, nicht mit der Polymerase II interagiert (Tsai et al., 2013) und auch nicht an dem Prozess der Transkription beteiligt ist (Holstege et al., 1998), sondern diese unterdrückt. Die Stöchiometrie des Kinasemodules zum Kernmodule ist sehr ähnlich, was den Rückschluss zulässt, dass fast der gesamte Anteil (ca.95%) an isoliertem Kinasemodule mit dem Kernmodul assoziiert ist und wenn überhaupt nur sehr wenig ungebunden vorliegt. Weiterhin zeigen diese Daten, dass alle zuvor beschriebenen Interaktionspartner die an der Transkription und der co-transkriptionalen Prozessierung beteiligt sind, nur über den Mediatorkomplex ohne Cdk8-Modul co-präzipitiert werden können.

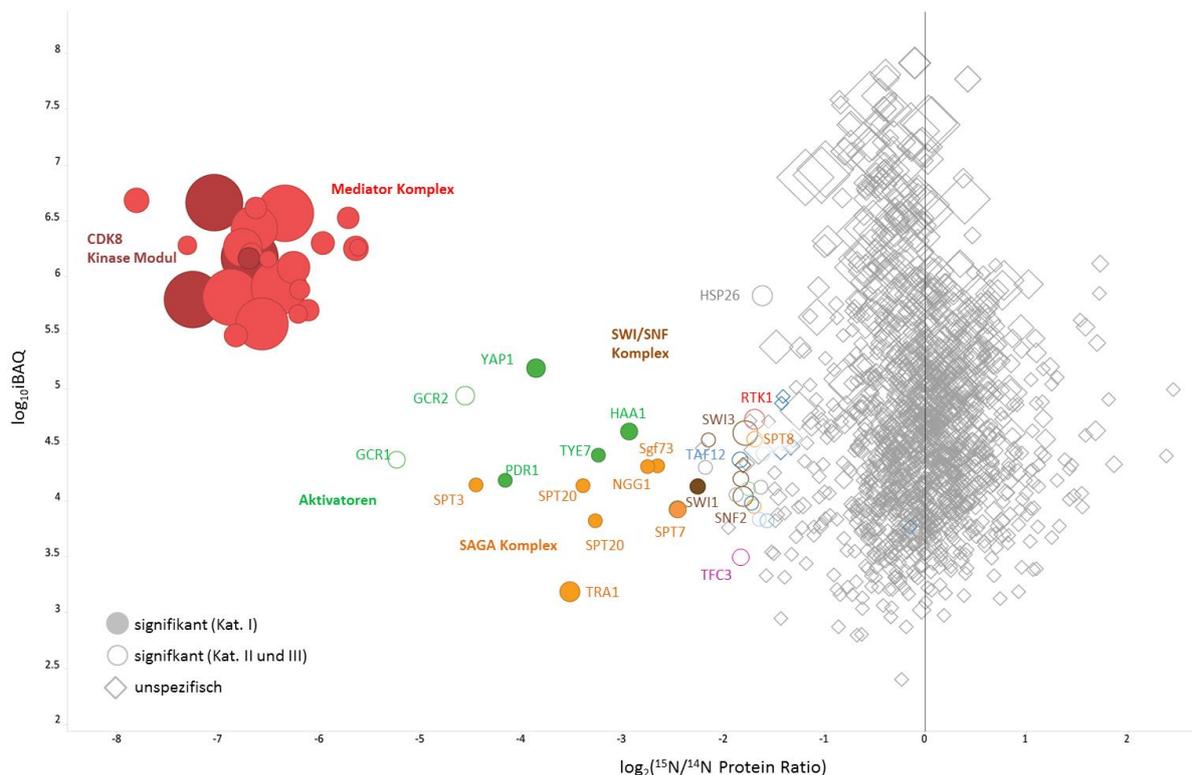


Abbildung 38 Darstellung aller Proteine die über Srb9-HA (^{14}N) und eine Wildtypkontrolle (^{15}N) co-isoliert wurden. Farblich hervorgehoben sind Transkriptionsaktivatoren, Untereinheiten des SAGA-Komplexes und des Swi/Snf-Komplexes.

Die Transkriptionsaktivatoren GCR1 und GCR2 sind an der Expression glycolytischer Gene beteiligt. Bei Chip-Analysen wurde der Mediatorkomplex an solchen Genen jedoch bisher nicht detektiert (Fan et al., 2006). Dies und der Umstand, dass sich diese Aktivatoren als Interaktionspartner des Cdk8-Mediators isolieren lassen, könnten darauf hinweisen, dass der Mediatorkomplex unter den hier verwendeten experimentellen Umständen eine repressive Wirkung auf die von diesen Transkriptionsfaktoren kontrollierten Gene hat indem er als 25 UE Komplex assoziiert mit diesen Transkriptionsfaktoren an den jeweiligen Promotorregionen assoziiert ist. Auf diese Weise wäre eine sehr schnelle Antwort auf zellulären Stress möglich. Dasselbe könnte auch für die Transkriptionsfaktoren Pdr1, Yap1 und Haa1 gelten. Pdr1 beispielsweise kontrolliert die Expression der ABC-Transporter Pdr5 und Snq2 und wird nur aktiv, wenn ein Ausschleusen toxischer Substanzen aus der Zelle nötig ist (Cui et al., 1999). Yap1 kontrollierte Gene codieren antioxidierende Enzyme, welche nur bei einer oxidativen Stressantwort benötigt werden (Fernandes et al., 1997).

4.2.3 Der Einfluss ausgewählter IP-Bedingungen auf das Interaktom

Die Bedingungen unter denen ein Zellaufschluss und eine Immunopräzipitation durchgeführt werden, haben einen enormen Einfluss auf die Art und Anzahl der co-präzipitierten Proteine. In einer Veröffentlichung von Hakhverdyan et al (Hakhverdyan et al., 2015) ist ausführlichst beschrieben, dass sich die Ergebnisse einer IP dramatisch verändern können, wenn bestimmte Komponenten wie Salzgehalt, Salzart und die Konzentration und Art des Detergenz geändert werden. Im Zuge der Optimierung des Experimentellen Designs wurden deshalb verschiedene Puffer, Detergenz-konzentrationen und Additive getestet um möglichst schonend und allumfassend Interaktionspartner zu identifizieren. Das folgende Kapitel soll ausgewählten Bedingungen gewidmet sein, deren Einfluss genauer untersucht wurde.

4.2.3.1 NP40 – Gehalt im Lysepuffer

Der Gehalt an Detergenz im Lysepuffer ist ein zweischneidiges Schwert. Zum einen lösen sich durch Detergenzien vor allem hydrophobe Proteine aus den aufgeschlossenen Zellen, zum anderen werden vor allem hydrophobe Interaktionen zwischen Proteinen aufgelöst. In Abbildung 39 sind die Proteinverhältnisse für die Immunopräzipitationen bei einem NP-40 Gehalt von 0.01% und 0.5% gegeneinander aufgetragen. Durch die Erhöhung des NP40 Gehaltes auf 0.5% im Lysepuffer gehen viele Interaktionspartner verloren, über 200 Proteine können nicht mehr als signifikant mit dem Mediatorkomplex co-isoliert werden. Über die Hälfte davon sind Proteine des Cytoplasmas, des Mitochondriums, des Endoplasmatischen Reticulums oder des Cytoskellets und waren auch vor der Erhöhung des NP40 Gehalts nur als schwache Interaktionspartner klassifiziert (Kategorie III). Andere wurden zuvor als sehr signifikant und abundant detektiert wie z.B der gesamte TFIIH und TFII E Komplex, die TFII F Untereinheit T2fb, der Elongationsfaktor TFII-S und auch einige Transkriptionsfaktoren (Pex19, Gcn4, Msn2). Auch die Interaktion zwischen einigen Untereinheiten der RNA-Polymerase II und der Polymerase I nimmt ab. So sind die beiden großen Untereinheiten der Polymerase I nicht mehr signifikant, der RENT-Komplex dagegen schon. Auch 13 Proteine der ribosomalen Biogenese (u.a. Rrp3, Dbp10, Mdn1 und UTP22) sind mit einem erhöhten NP40-Gehalt im Lysepuffer nicht mehr signifikant. Auf die 2 Untereinheiten der Polymerase III (Rpc1 und 2) hat die Zunahme von NP40 interessanterweise keinen Einfluss, auch bei 0.5% NP40 im Lysepuffer lassen sich noch beide Untereinheiten als Interaktionspartner isolieren. Über 30 Proteine hingegen konnten nur mit einer erhöhten NP40 Konzentration detektiert werden. Zu diesen zählen unter anderem der Transkriptionsfaktor Tup1 Gln3, die Tor1-Komplex Untereinheit Kog1, das Nucleoporin Nsp1 und interessanterweise auch das Histon H1, welches bisher in keiner IP detektiert werden konnte.

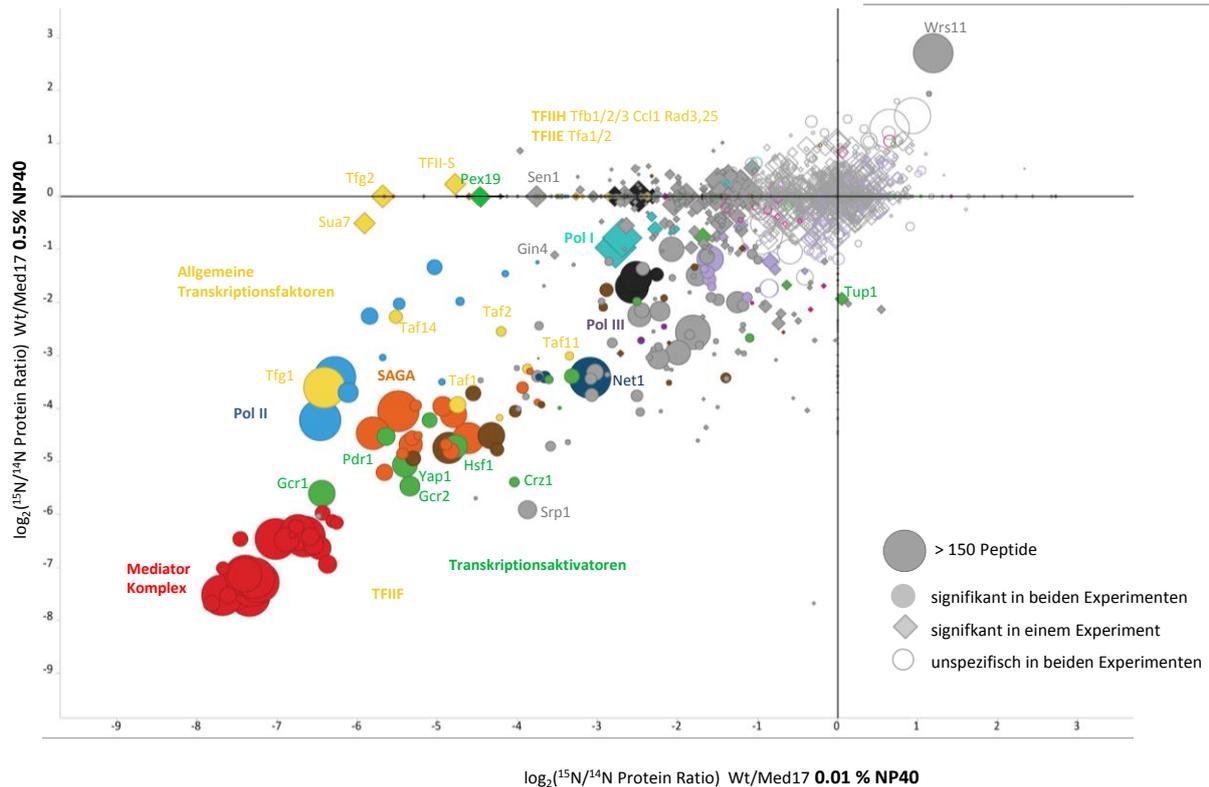


Abbildung 39 Co-Immunopräzipitation mit Med17-HA(¹⁴N) und Wt(¹⁵N) mit jeweils 0.01% und 0.5% NP40 im Lysepuffer. Von beiden Experimenten wurden jeweils 3 Replikate angefertigt und die Proteinverhältnisse (¹⁵N(Wt)/¹⁴N(Med17-HA)) gegen einander aufgetragen.

4.2.3.2 Größe der DNA- und RNA-Fragmente

Die Analyse des Interaktoms des Mediators umfasst zu einem großen Teil Proteine, die mit der DNA oder der mRNA assoziiert sind. Deshalb ist die Frage angebracht, welche Interaktionen wirklich über Protein-Protein Wechselwirkung stattfinden, und welche nur RNA oder DNA-vermittelt sind. Die Methode des Cryo-Grinding erlaubt einen schonenden Zellaufschluss, der selbst große Proteinkomplexe weitestgehend intakt lässt (Oeffinger et al., 2007). Welche Größe die DNA nach diesem Aufschluss hat, war nicht bekannt. Nach der Etablierung der Aufschlussmethode wurden zunächst mittels einer Chloroform/Phenol Fällung alle Nukleinsäuren aus dem Zelllysate präzipitiert um Anhand der Größe der Fragmente einschätzen zu können, ob ein zusätzlicher Schritt zum Abbau der DNA erforderlich ist. In Abbildung 40a. ist zu erkennen, dass sich mit dieser Methode vor allem Nukleinsäuren mit einer Länge von circa 1 und 1.5 kb anreichern lassen. Weiterhin reicht die Größe präzipitierter Nukleinsäuren von wenigen 100 Basenpaaren bis 3 kb. Trotz ausführlicher Optimierungen ließ sich nicht eindeutig zeigen, ob es sich dabei um DNA oder um RNA handelt und ob diese durch die Verwendung von Nukleasen im Lysat abgebaut wird. Die spätere Verwendung eines DNA-Aufreinigungskits der Firma Zymoresearch ermöglichte es spezifisch DNA-Fragmente mit einer Größe von über 10 kb aus dem Zelllysate zu isolieren, diese werden spezifisch von DnaseI verdaut (Abbildung 40.b). Auch aus der Suspension von Zellpulver und Lysepuffer (Abbildung 40.c) lassen sich DNA Moleküle mit einer Länge von über 10 kb isolieren. Außerdem sind deutlich zwei Banden im Bereich 3.5 und 5.5 kb zu erkennen. Nach dem Zentrifugieren der Suspension sind diese Banden immer noch zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass im verwendeten Zelllysate große DNA-Fragmente den Aufschluss überdauern haben.

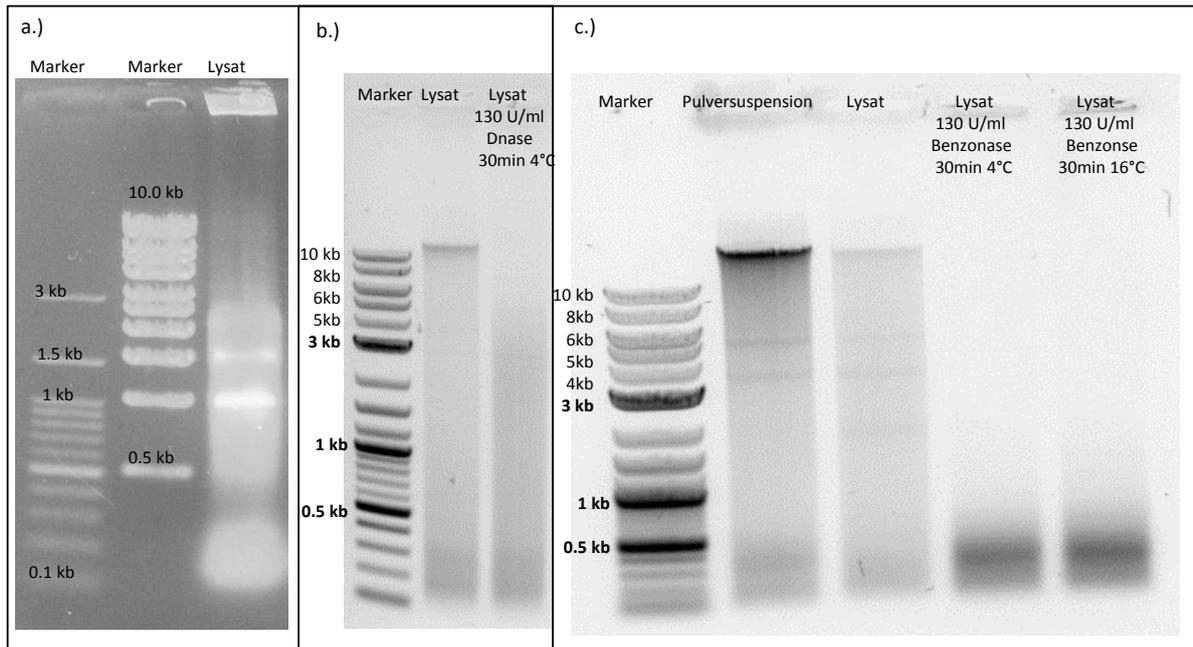


Abbildung 40 DNA Agarosegel (0.5%) a.) Präzipitation der RNA und DNA mit Chloroform und Phenol aus Zellysate b.) Isolierte DNA aus zentrifugiertem Zellysate (Zymoreseach – Quick DNA Kit®) nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C mit und ohne DNase I c.) Isolierte DNA (Zymoreseach – Quick DNA Kit®) aus der Lysepuffer/Pulversuspension vor dem Zentrifugieren, aus dem Zellysate nach dem Zentrifugieren nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C ohne und mit Benzonase und nach einer Inkubation mit Benzonase für 30 Minuten bei 16°C.

Um auszuschließen, dass Proteine über diese DNA- oder RNA-Moleküle mit dem Mediator co-isoliert wurden, wurde für ein weiteres Experiment die Suspension aus Zellpulver und Lysepuffer mit Benzonase versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Lysat auf DNA-Moleküle überprüft (Abbildung 40.c.), es konnten keine großen Moleküle mehr isoliert werden. Proteine die zuvor über RNA oder DNA an den Mediator assoziiert waren, sollten nun nicht mehr als signifikanter Interaktionspartner erscheinen. Die Auswertung der Co-Immunpräzipitation dieses Lysats ergab jedoch, dass durch die Behandlung mit Benzonase nur sehr wenige Interaktionspartner eindeutig durch den Einsatz von Benzonase „verschwanden“ (Abbildung 41). Im Gegenteil, viele Proteine vor allem solche, die in die rRNA-Prozessierung (z.B Rrp5, Nop1, 2) und Ribosomenbiogenese (z.B Urb1, Noc2) involviert sind, lassen sich aus dem Lysat, welches mit Benzonase behandelt wurde mit einer viel niedrigeren H/L-Ratio isolieren und interagieren demnach spezifischer mit dem Mediatorkomplex. Des Weiteren erscheinen nun viele Proteine der 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten (lila) vermehrt als Interaktionspartner. Die Polymerase I dagegen hat in dem Experiment mit Benzonase eine geringere Affinität zum Mediator als ohne Benzonase. Dies gilt auch für einige Untereinheiten des TFIID. Interessanterweise verändert der RENT-Komplex seine Affinität nicht. Interessanterweise lässt sich bei der Verwendung von Dnase I in diesem Experiment (siehe Anhang 12) kaum ein Effekt beobachten, lediglich einige Transkriptionsaktivatoren können nicht mehr als signifikant identifiziert werden.

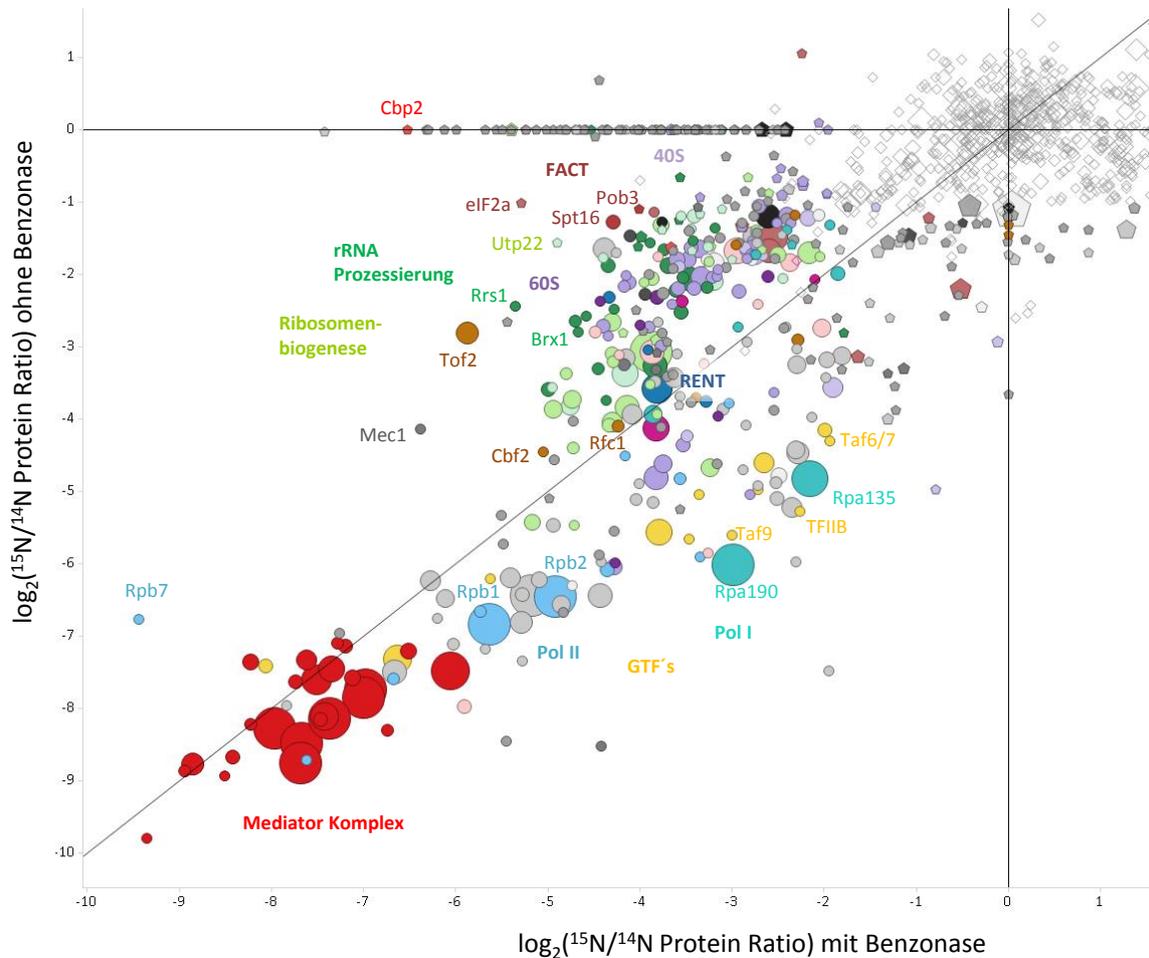


Abbildung 41 Co-Immunpräzipitation des Mediator Komplexes über Med17-HA und Wt. Aufgetragen sind die Proteinverhältnisse ($\log_2(H/L)$) der Experimente mit der Verwendung von Benzonase gegen das Kontrollexperiment ohne Benzonase.

4.2.4 Unterscheidung von stabilen und transienten Interaktionspartnern

4.2.4.1 Austausch transienter Interaktionspartner

Die über 400 Proteine, die wir durch unseren Ansatz als Interaktionspartner identifizieren konnten, warfen die Frage auf, welche von denen dauerhaft und welche nur transient an den Mediator binden. Um diese zwei Arten von Interaktion systematisch voneinander zu unterscheiden, führten wir ein sogenanntes *purification-after-mixing*-Experiment (kurz PAM) durch (Wang and Huang, 2014).

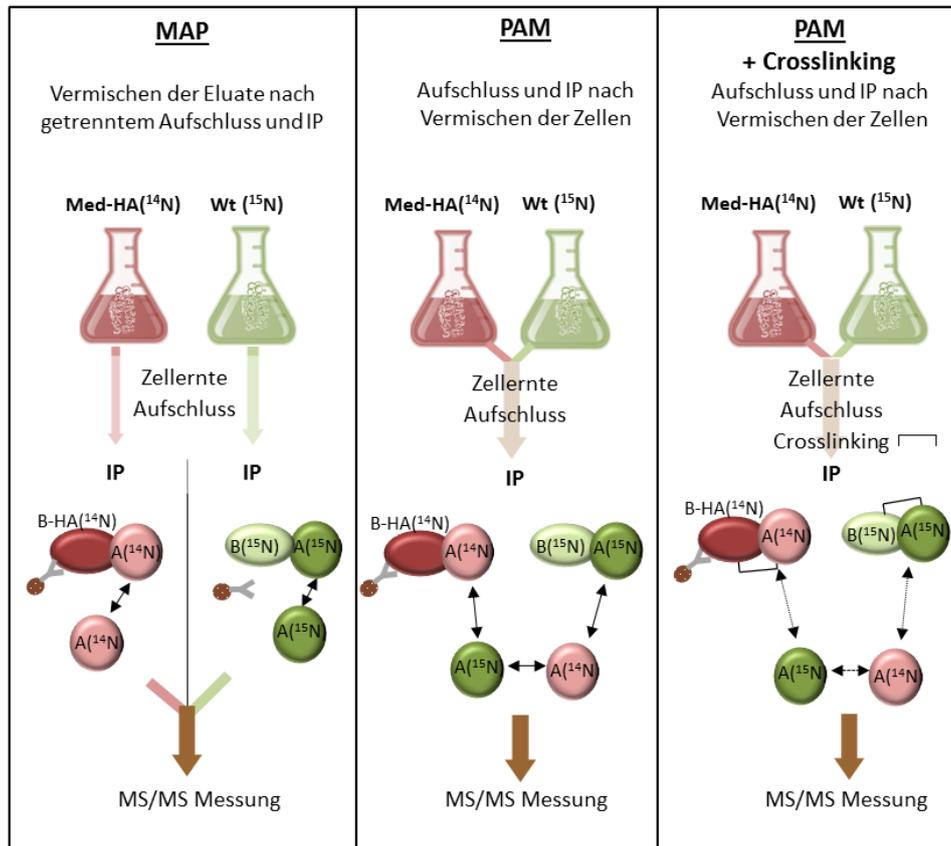


Abbildung 42 Übersicht und Vergleich zwischen einem PAM (*Purification after Mixing*) und einem MAP (*Mixing after Purification*) Experiment. MAP: Die Zellen werden getrennt voneinander geerntet, aufgeschlüsselt und 2 Immunopräzipitationen durchgeführt. Erst die Eluate werden miteinander vermischt. PAM: Die Zellen werden nach dem Erreichen der gewünschten OD miteinander vermischt und zusammen geerntet und aufgeschlüsselt. Während der Immunopräzipitation bindet der das HA-getaggte Bait (B-HA) an die Antikörper an den magnetischen Beads. Der Interaktionspartner A bindet transient und kann während der IP durch sein Isotopolog aus der ^{15}N -Kultur ausgetauscht werden. Durch das Vernetzen der Proteine kann dieser Austausch teilweise verhindert werden (PAM +Crosslinking).

Im Unterschied zum vorherigen Ablauf werden für dieses Experiment die in jeweils ^{14}N - (Med17-HA) und ^{15}N -Medium (Wt) gewachsenen Zellen direkt vor der Ernte in einem 1:1 Verhältnis vermischt. Der Zellaufschluss und die Immunopräzipitation werden nicht mehr für den getaggten Stamm und die Kontrolle parallel durchgeführt, sondern in einem Experiment. Dadurch vermischen sich die ^{14}N - und ^{15}N -markierten Lysate und auch deren Proteine (Abbildung 42). Schwach gebundene Proteine oder Proteine mit einer hohen Assoziationsstärke aber gleichzeitig hoher Austauschrate ($K_{D(\text{on/off})}$), werden vor allem während der Inkubation des Lysates auf den magnetischen Beads vom Mediator ab dissoziieren aber durch ihre Bindungsaffinität auch wieder binden. Da sich die leichten und schweren Varianten aller Proteine in einem 1:1 Verhältnis in dem gemischten Lysat befinden, werden auch alle transienten Interaktionspartner nach und nach ein $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ Verhältnis von 1:1 annehmen und der Interaktionspartner zu 50% ^{14}N und zu 50% ^{15}N -markiert sein. Dadurch lässt er sich aber nicht mehr vom unspezifischen Hintergrund unterscheiden. Stabile Interaktionspartner werden dagegen gar nicht oder nur wenig ausgetauscht und haben auch nach der IP ein ähnliches $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ Verhältnis, wie die getaggte Mediatoruntereinheit an die sie binden. Dieser Austausch wurde bisher in den Experimenten zuvor durch die parallele Durchführung der beiden Co-IP's verhindert. Man nennt dann diese Art von Experiment auch *Mixing-after-Purification* – kurz MAP, da die unterschiedlich markierten Proteine erst nach der Aufreinigung vereint werden. Dieses Experiment erlaubt es die Kinetik in einem Interaktom zu analysieren. Abbildung 41 zeigt ein Triplikot eines PAM-Experimentes mit Med17-HA und der Wildtyp-Kontrolle. Es ist eindeutig zu erkennen, dass nur die 20 Untereinheiten Kernmediators-also des

Kopf-, Mittel- und Schwanzmodules- stabil an Med17 binden. Die Untereinheiten des Kinasemodules zeigen nach 2 Stunden Inkubationszeit ein $\log_2(H/L)$ -Verhältnis von nahezu 0 und binden demnach nur transient. Das gleiche gilt für die RNA-Polymerase II und alle anderen Bestandteile des Prä-Initiationskomplexes. Das bedeutet, dass das gesamte vorher beschriebene Interaktom des Mediators hoch dynamisch ist. In Abbildung 43 ist jedoch auch zu erkennen, für dass das Kinasemodul und auch andere Proteine trotz der niedrigen Werte des $^{14}/^{15}N$ -Verhältnisses eine Signifikanz der Kategorie I angegeben ist. Dieser Umstand ergibt sich daraus, dass der Austausch für diese Proteine nicht ganz vollständig war und sich der $\log_2(H/L)$ Wert auch wenn er sehr nahe bei 0 liegt trotzdem vom Hintergrund abhebt. Dies ist nur möglich, weil die Streuung dieser unspezifischen Proteine extrem schmal ist. Bei einer parallelen Probenaufbereitung – bei einem MAP-Experiment ist diese Streuung breiter (siehe auch Abbildung 31). Zu den in diesem Zusammenhang signifikanten Proteinen gehört neben dem Kinasemodul, den beiden großen Untereinheiten der Polymerase II auch die Chaperone Ssa1 und Ssa2, welche unter anderem für Lokalisation von neu synthetisierten Kernproteinen verantwortlich sind (Kim et al., 1998b; Shulga et al., 1999). Betrachtet man die H/L-Verhältnis der Mediatorkernuntereinheiten selbst, fällt auf, dass sie ebenfalls niedriger sind im Vergleich zum Bait Med17-HA, welches ja überhaupt nicht ausgetauscht werden kann. Vor allem die Untereinheiten Med5, Med15, Med2 und Med3 scheinen innerhalb des Komplexes dynamischer am Rest des Kernmediators gebunden zu sein als die anderen Komponenten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, in denen dieser Subkomplex unabhängig vom Rest des Mediators agieren kann und an DNA-gebunden Transkriptionsfaktoren wie Hsf1 rekrutiert wird (Anandhakumar et al., 2016). Ein *Purification after mixing* Experiment mit dem FLAG-getagtem Cdk8-Modul gibt ein komplementäres Bild (Anhang 11): alle Interaktionspartner und die Untereinheiten des Kernmodules binden nur transient und werden während der IP ausgetauscht. Die 4 Untereinheiten des Kinasemoduls selbst scheinen untereinander sehr stabil zu binden. Das einzige Protein, welches in allen 3 Replikaten des Med17-PAM Experimentes mit einem hohen H/L-Verhältnis isoliert werden konnte, ist Smt3. Smt3 ist ein ubiquitinähnliches Protein (*Small Ubiquitin-like Modifier* kurz SUMO), welches über Lysine kovalent an Proteine konjugiert wird. Durch diese kovalente Bindung kann während der IP SMT3 nicht durch ^{15}N -Isotopologe ersetzt werden. Welche Untereinheit/en des Mediators sumoyliert ist oder sind, geht aus diesen Daten nicht hervor. Mit der Med17-Untereinheit ließ sich lediglich das dazugehörige SUMO-aktivierende Enzym Uba2 isolieren. In der Literatur findet sich ein Hinweis auf eine Sumoylierung der Mediatoruntereinheit Med5 (Wykoff and O’Shea, 2005).

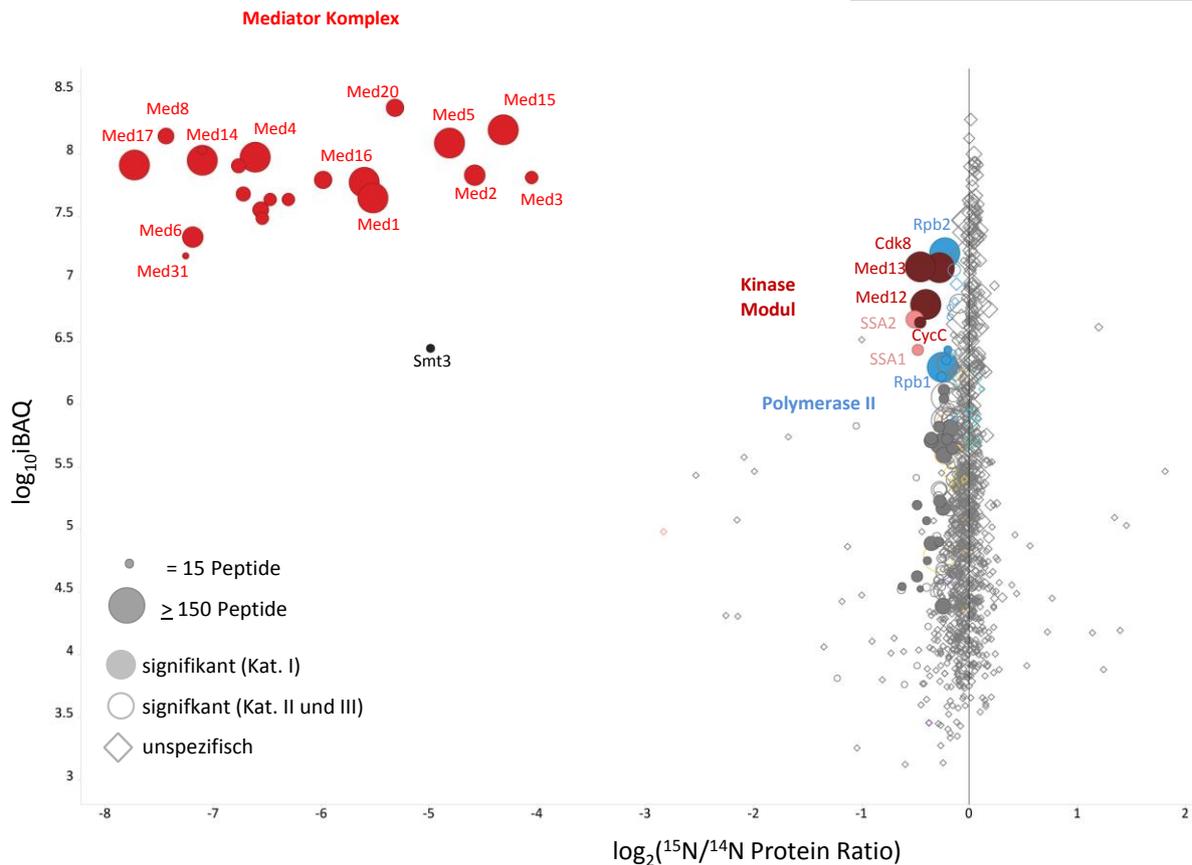


Abbildung 43 Co-Immunopräzipitation von Med17-HA im Rahmen eines *purification-after-mixing* (PAM) Experiments (Triplikate). Die Zellen (^{14}N -Med17-HA und ^{15}N Wt) wurden vor der Ernte miteinander vermischt und dann als ein Experiment weiter bearbeitet. Farblich markiert sind der Mediator Komplex, das Kinase Modul, Untereinheiten der Polymerase II und die Chaperone SSA1 und SSA2.

4.2.4.2 Verhinderter Austausch durch Glutaraldehyd Crosslinking

In einem weiteren Schritt sollte dieser Austausch durch partielles, kovalentes Verlinken der Proteine durch Glutaraldehyd verlangsamt werden. Dadurch sollte sich unterscheiden lassen, welche Proteine direkt und welche nur indirekt über andere Proteine mit dem Mediator assoziiert sind. Zu diesem Zweck wurden die gemeinsam geernteten Kulturen nach ihrem Aufschluss durch Kryogrinding mit Lysepuffer versetzt, der geringe Mengen Glutaraldehyd enthält. Glutaraldehyd vernetzt unspezifisch nur Proteine miteinander die sich zu diesem Zeitpunkt in unmittelbarer Nähe von einander befinden (ein sogenanntes „zero-length“ Crosslink Reagenz). Da vor der Zugabe des Puffers die aufgeschlossenen Zellen bei tiefsten Temperaturen lagerten, konnte bis dahin kein Austausch zwischen den ^{14}N und ^{15}N markierten Isotopologen stattfinden. Interaktionspartner, die direkt oder räumlich sehr nahe an den Mediator Komplex binden, werden zum Teil kovalent verlinkt und können so nicht mehr während der IP ausgetauscht werden und eine 1:1-Verhältnis annehmen. Das Verhältnis zwischen leichter und schwerer Isoform wird sich je nach Verlinkungsgrad wieder in Richtung Mediator verschieben. Mit diesem Ansatz können direkte Interaktionspartner des Mediator Komplexes ermittelt werden (Subbotin and Chait, 2014). Für die Optimierung dieses Verfahrens wurden zunächst verschiedene Konzentrationen getestet. Zellpulver (Med17-HA und Kontrollstamm) wurde mit Lysepuffer versetzt, der 0.1%, 0.5% und 1% Glutaraldehyd enthält. Nach jeweils 5, 10 und 20 Minuten wurde die Reaktion mit einer 1 molaren Tris-Lösung abgebrochen und die Lysate ab zentrifugiert. Mit den Überständen wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt und die isolierten Proteine mit LDS-Probenpuffer von den HA-Beads eluiert. Die Elutionen wurden zunächst mittels eines Western Blots analysiert (Abbildung 44.). Ein Verlinken der HA-fusionierten Mediatoruntereinheit Med17 mit anderen Proteinen ist schon

ab einer Konzentration von 0.1% und nach 5 Minuten zu erkennen., die mit HA-Antikörpern detektierte Bande erscheint in einem Bereich des Gels mit höheren Molekulargewichten. Die Intensität der vernetzten Untereinheit Med17 steigt sich mit zunehmender Inkubationszeit jedoch nicht, was darauf hinweist, dass die Vernetzungsreaktion nicht zeitabhängig ist.

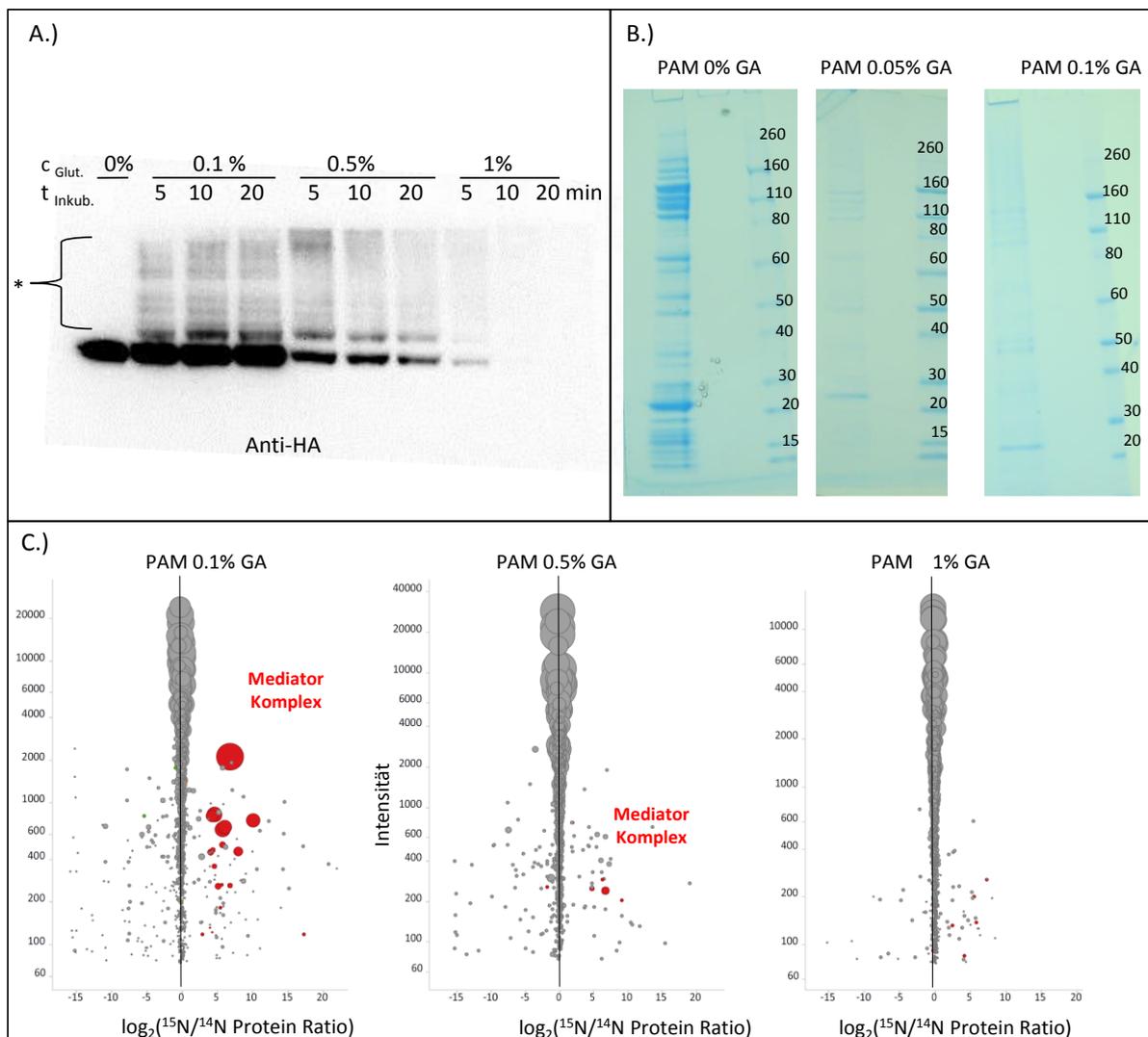


Abbildung 44 Optimierung der Vernetzung durch Glutaraldehyd: **A.)** Western Blot Analyse verschiedener Konzentrationen ($c_{\text{Glut.}}$) und Reaktionszeiten ($t_{\text{Inkub.}}$) des Glutaraldehyd mit den Proteinen im Zellysate (^{14}N Med17-HA 1:1 Wt ^{15}N) bevor die Reaktion mit der Zugabe einer 1 molaren Tris-Lösung abgestoppt wurde. Aufgetragen sind die Eluate der Immunpräzipitation mit diesen Lysaten. Die Detektion erfolgte mit einem anti-HA Antikörper. Mit einem Stern (*) gekennzeichnet, sind die Proteine, die mit Med17-HA verlinkt sind und durch ihr größeres Molekulargewicht im SDS-PA Gel weiter oben detektiert werden. **B.)** SDS-PAGE der Immunpräzipitationseeluate mit Zellysaten, die 5 Minuten mit 0%, 0.05% und 0.1% Glutaraldehyd inkubiert wurden. Alle Gele wurden mit Coomassie anfärbt. **C.)** MS/MS Analyse der Immunpräzipitationen aus A.) mit einer Reaktionszeit von 5 Minuten. In Rot sind die als signifikant identifizierten Untereinheiten des Mediators dargestellt. Alle Eluate wurden in Lösung verdaut.

Werden 0.5% Glutaraldehyd verwendet, lassen sich noch größere vernetzte Proteinkomplexe im Western Blot erkennen und die Intensität der unverlinkten Med17-HA Bande sinkt. Bei 1% Glutaraldehyd, kann nur noch sehr wenig unvernetztes Med17-HA detektiert werden. Die Immunpräzipitation der Lysate, die jeweils 5 Minuten mit den verschiedenen Glutaraldehydkonzentrationen inkubiert wurden, wurden in Lösung verdaut (siehe 3.2.4.3). Die MS/MS Analysen dieser Proben zeigen einen dramatischen Abfall an isoliertem Mediator Komplex mit zunehmender Konzentration an Glutaraldehyd (Abbildung 44.C.). Schon bei der Verwendung von 0.1%

Glutaraldehyd lassen sich nur noch 19 Untereinheiten isolieren, bei 0.5% nur noch 4 Untereinheiten und bei 1% nur vereinzelte Peptide. Durch das Vernetzen ist die HA-fusionierte Untereinheit Med17 entweder unlöslich geworden und wurde mit ab zentrifugiert oder der HA-Tag ist durch die Reaktion mit Glutaraldehyd für die Antikörper auf den magnetischen Beads nicht mehr zugänglich. Aus diesem Grund wurden in zwei weiteren Experimenten die Konzentrationen 0.05% und 0.1% verwendet. Die Eluate dieser Experimente wurden auf eine SDS-PA-Gel aufgetragen und die Proteine mit Coomassie angefärbt (Abbildung 44.B.). Im Vergleich zu einer IP ohne die Verwendung von Glutaraldehyd ist die Intensität der isolierten Proteine auch schon bei 0.05% sehr viel geringer. Bei einer Konzentration von 0.1% lassen sich fast keine Banden mehr erkennen.

Die MS/MS Analyse der Gele zeigt (Abbildung 45), dass das Verlinken mit Glutaraldehyd den kompletten Austausch mehrere Interaktionspartner verhindern konnte. Mit 0.05% Glutaraldehyd Anteil im Puffer, konnten Proteine des kompletten Cdk8-Kinasemoduls an den Mediator verlinkt werden. Da dies nicht vollständig geschah, liegt das $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis dieser Proteine zwischen den Werten der MAP und PAM Experimente. Weitere verlinkte Proteine sind Transkriptionsaktivatoren wie Pex19, Hsf1, Pdr1, das Histon H2B.1 und Untereinheiten des SAGA und Swi/Snf Komplexes. Bei einer Konzentration von 0.1 % Glutaraldehyd im Lysepuffer ist das Verhältnis dieser Interaktionspartner sogar noch mehr in Richtung Mediator verschoben. Des Weiteren kommen Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIID und auch das 2 großen Untereinheiten der RNA-Polymerase II haben in diesem Experiment eine Signifikanz von 1. Der Austausch der Mediatorkernuntereinheiten wie er in Abbildung 43 zu erkennen ist, scheint durch das Vernetzen mit 0.1% Glutaraldehyd weitestgehend unterbunden worden zu sein. Durch diese zusätzliche Stabilisierung des Kernkomplexes, war es möglich auch Interaktionspartner in ihrer Kinetik zu stabilisieren, die nicht nur mit dem Bait interagieren. Tup1 und Pdr1 sind beispielsweise im Gegensatz zu Rpb1 (Robinson et al., 2012) keine direkten Interaktionspartner von Med17 sondern interagieren mit dem Schwanzmodul (Thakur et al., 2009). Demzufolge lassen sich durch die Verwendung von Glutaraldehyd direkte Interaktionspartner des gesamten Mediators identifizieren.

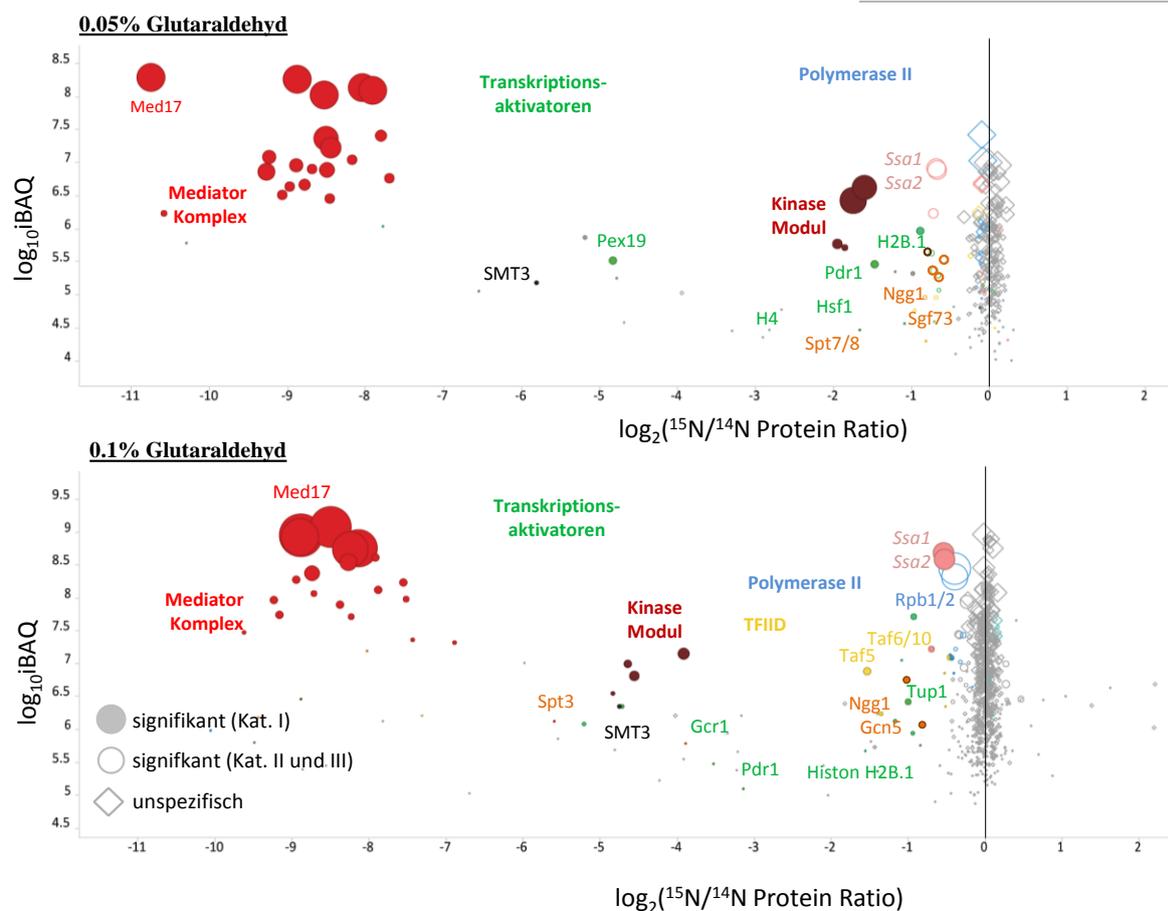


Abbildung 45 MS/MS Analyse der Co-Immunopräzipitationen von Med17-HA im Rahmen eines *purification-after-mixing* (PAM) Experiments in Kombination mit Glutaraldehyd-Crosslinking (SDS-PAGE Gele aus Abbildung 44). Die Zellen (^{14}N -Med17-HA und ^{15}N Wt) wurden vor der Ernte miteinander vermischt und dann als ein Experiment weiter bearbeitet. Die Zellmischung wurde mittels Kryogrinding aufgeschlossen und in Glutaraldehyd-haltigem Lysepuffer aufgenommen (oben: 0.05% Glutaraldehyd im Lysepuffer, unten 0.1% Glutaraldehyd im Lysepuffer). Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Vernetzungsreaktion mit 1M Tris beendet und das PAM Experiment fortgesetzt. Von jedem Experiment wurde nur 1 Replikat erzeugt.

Durch die Verwendung von noch mehr Glutaraldehyd (GA) würde man erwarten, dass auch noch mehr Interaktionspartner stabilisiert werden. Wie aber schon in Abbildung 44.B. und C zu erkennen ist, sinkt mit zunehmender GA-Konzentration die Intensität und auch die Anzahl der isolierten Proteine, die überhaupt quantifiziert werden können. Schon bei einer Verwendung von 0.05% sank die Gesamtanzahl von durchschnittlich 1300 auf 600 ab, was ein Detektieren schwacher bzw. substöchiometrischer Interaktionspartner unmöglich macht.

4.2.5 Der Einfluss von Rapamycin auf das Interaktom des Mediator Komplexes

Die wichtigste Aufgabe des Mediator Komplexes besteht darin, durch die Interaktion zwischen Transkriptionsregulatoren und den Proteinen des Pre-Initiationskomplexes die Transkription zu regulieren. Verändern sich Umwelteinflüsse oder wird das Nahrungsangebot knapp, muss die Hefezelle über die Synthese neuer Proteine an diesen Umstand anpassen (Brauer et al., 2005; DeRisi et al., 1997). Da diese Adaption auch über den Mediator gesteuert ist, sollte sich unter gezielten Änderungen der Umweltbedingungen auch dessen Interaktom ändern.

Rapamycin ist ein lipophiles Macrolid aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* und neben seiner fungiziden Wirkung auch für seine immunsuppressive bekannt. Das wichtigste Target ist die nach ihm benannte TOR (*target of rapamycin*)-Kinase. Diese hoch konservierte Serin/Threonin Protein Kinase ist

der zentrale Bestandteil eines Signalwegs, der das Zellwachstum und den Metabolismus in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und zellulärem Stress reguliert (Tsang et al., 2007) - der sogenannte TOR Signalweg (De Virgilio and Loewith, 2006). Die Behandlung von Hefezellen mit Rapamycin führt zu einer Signalkaskade, die Nährstoffmangel signalisiert, ganz ähnlich dem Zustand den Zellen erreichen, wenn sie sich in der stationären Wachstumsphase (G_0 -Phase) befinden. Dies führt zu einer dazu, dass G_0 -spezifische Gene von der Pol II transkribiert werden und auch zu einer Inhibierung der rRNA Synthese durch die Polymerase I und III (Zaragoza et al., 1998). Nach 30 Minuten Behandlung mit Rapamycin sinkt die Syntheserate von rRNA um 90% und auch die Assoziation der Polymerase I und des Transkriptionsinitiationsfaktors Rrn3p mit der rRNA Promotor sinkt um 35% (Claypool et al., 2004). Sollte der Mediator an der rRNA Synthese beteiligt sein und die Polymerase I wirklich zu seinem Interaktom gehören, sollte sich dies durch Rapamycin verändern. ^{14}N und ^{15}N -markierte Hefezellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600}=0.7-0.8$) mit Rapamycin (Endkonzentration 500ng/ml) versetzt und 30 Minuten lang bei 30°C und 230 rpm inkubiert. Die Ernte, der Aufschluss und die Immunopräzipitation erfolgten bis nach der Elution getrennt voneinander (MAP – Experiment). Im Zuge einer vorausgehenden Real-Time PCR Analyse, sollte gezeigt werden, dass trotz der Nährstoffmangelsituation, in der sich die Hefezellen durch das Minimalmedium von vornherein befanden, das Rapamycin nach 30 Minuten einen signifikanten Einfluss auf die Expression ausgewählter ribosomaler und metabolischer Gene hat (Hardwick et al., 1999). In Abbildung 46 ist eindeutig zu erkennen, dass nach 30 min Inkubation mit Rapamycin die Transkriptionsrate ribosomaler Protein-Gene erwartungsgemäß sinkt und die glykolytischer Gene ansteigt.

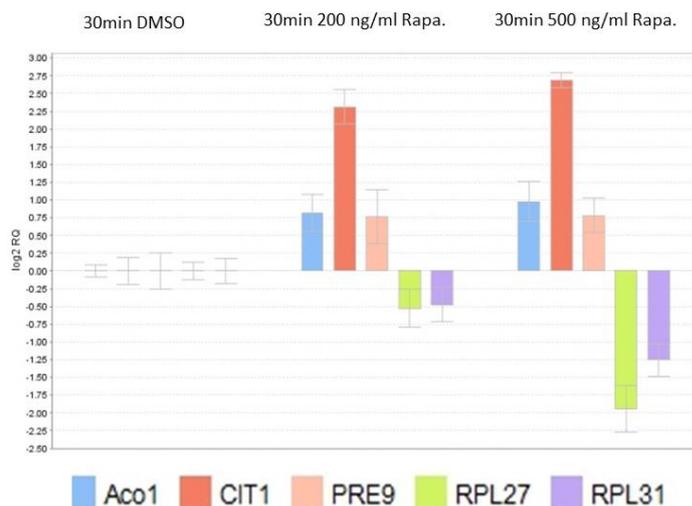


Abbildung 46 Grafische Darstellung einer Real-Time PCR Analyse der RNA gewonnen aus den Hefezellen nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur ohne und mit 200 oder 500 ng/ml Rapamycin. Alle Werte sind unabhängig voneinander 3fach bestimmt und auf Aktin normalisiert. Die Abkürzungen stehen für folgende Gene: Aco1-Aconitase, CIT1: Citrat Synthase 1, Pre9: 20S Proteasom Untereinheit alpha 3, Rpl27/Rpl31-60S Untereinheiten L27A und L31B.

Da der Effekt mit 500ng/ml eindeutig stärker ausfiel, wurde sich für diese Konzentration entschieden. Der Einfluss des Rapamycins auf das Interaktom des Mediators ist in Abbildung 47. dargestellt. Die beiden großen Untereinheiten der RNA-Polymerase I, alle 3 Untereinheiten des RENT-Komplexes und auch die große Untereinheit der Polymerase III gehören auch nach der Rapamycinbehandlung zu den signifikanten Interaktions-partnern des Mediator-Komplexes. Rund 160 andere Proteine haben jedoch an Signifikanz verloren. Dazu gehören einige Transkriptionsinitiationsfaktoren der Pol I und III, der gesamte TFIID Komplex und viele Proteine die an der rRNA Prozessierung und der Ribosomen Biogenese beteiligt sind. Auch viele der Transkriptionsfaktoren, lassen sich nicht mehr als signifikante Interaktionspartner identifizieren, darunter Met32 und Gcn4, die direkt an der Transkription von Proteinen beteiligt sind, die für die Synthese von Aminosäuren benötigt werden (Blaiseau et al., 1997; Hinnebusch and Natarajan, 2002) und Tye7, welches für die Transkriptionsaktivierung glykolytischer Gene essentiell ist (Sato et al., 1999).

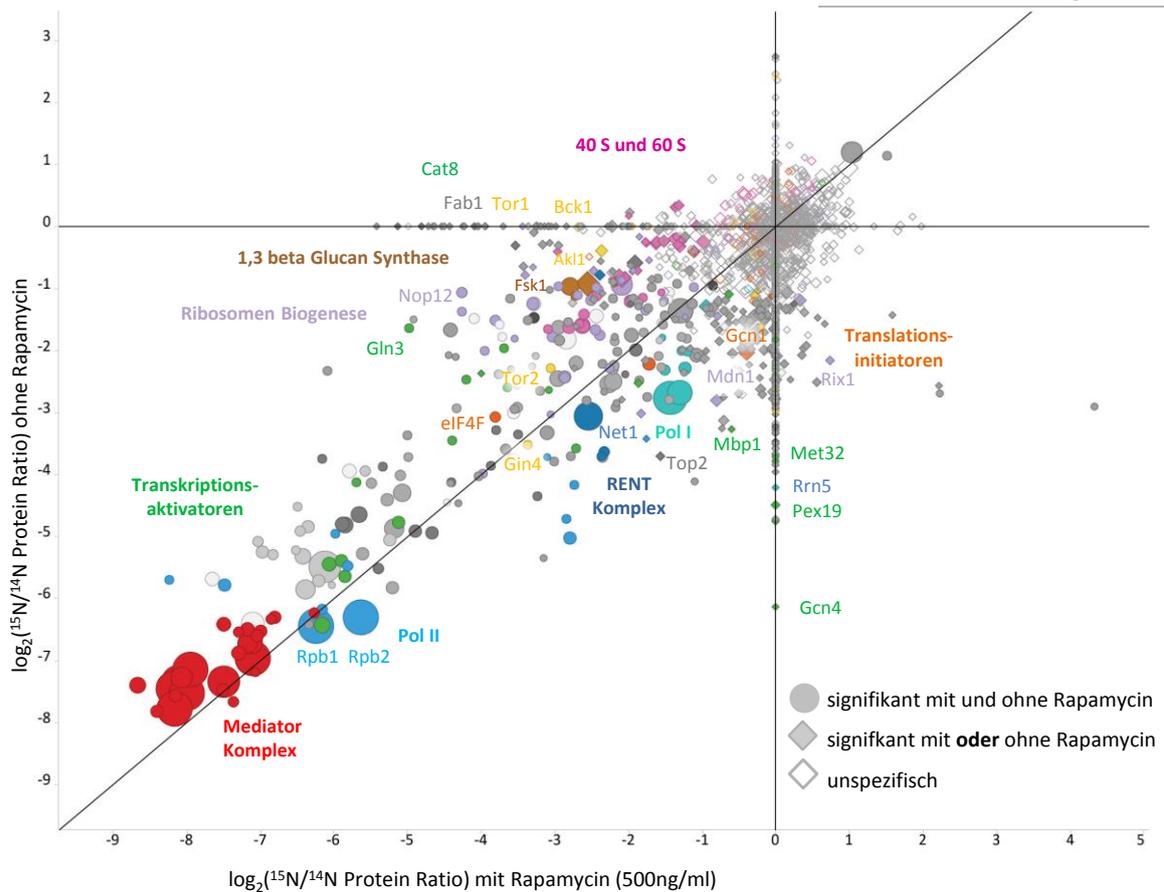


Abbildung 47 Grafische Darstellung der Immunopräzipitationen des Mediatorkomplexes mit und ohne Verwendung von 500ng/ml Rapamycin. Auf der X-Achse sind die $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Proteinverhältnisse des Triplikats mit Zellen (Wt und Med17-HA) aufgetragen, die 30 Minuten mit 500ng/ml Rapamycin inkubiert wurden. Auf der Y-Achse sind die $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Proteinverhältnisse des Triplikats mit Zellen (Wt und Med17-HA) aufgetragen, die ohne Rapamycin inkubiert wurden. Die Proteine wurden alle mindestens mit 10 Peptiden identifiziert.

Auf der anderen Seite sind über 70 Proteine durch die Behandlung mit Rapamycin als mögliche Interaktionspartner dazu gekommen. Interessanterweise, gehören zu diesen einige ribosomale Untereinheiten, sowie Proteine des Nucleolus (siehe Tabelle 12). Auch mehrere Proteinkinasen können nach der Rapamycinbehandlung als signifikant identifiziert werden, darunter auch Tor 1 und auch Akl1. Akl1 ist eine Proteinkinase die an der Tor2-abhängigen Regulierung der Endocytose beteiligt ist (Rispalet al., 2015). Die Proteinkinase Tor2 ist nicht sensitiv für Rapamycin (Loewith et al., 2002) und signifikanter Interaktionspartner mit und ohne Rapamycin. Ein weiterer interessanter Interaktionspartner, dessen Proteinverhältnis sich durch Rapamycin enorm gesteigert hat, ist der Transkriptionsfaktor Gln3. Dieser reguliert den Stickstoffverbrauch und -einbau. Durch die von ihm regulierte Gene codieren für Enzyme die einen Wechsel der Stickstoffquelle ermöglichen – von Glutamin auf Glutamat. Bei einem Überangebot von Stickstoff z.B in Form von Glutamin ist Gln3 zusammen mit Ure2 im Cytoplasma der Zelle co-lokalisiert und kann nicht an die Promotorregionen seiner Targetgene binden. Durch einen Mangel an Stickstoff oder der Zugabe von Rapamycin dissoziiert dieser Komplex und Gln3 kann in den Kern gelangen (Beck and Hall, 1999). Auch von anderen mit Rapamycin signifikanten Proteinen wie dem Transkriptionsaktivator Cat8 und dem Protein Fap1 ist bekannt, dass sie nur bei Nährstoffmangel in den Zellkern lokalisieren (Kunz et al., 2000). Zudem ist Cat8 ein Transkriptionsaktivator, der die Transkription glyconeogenetischer Gene aktiviert (Bojunga and Entian, 1999).

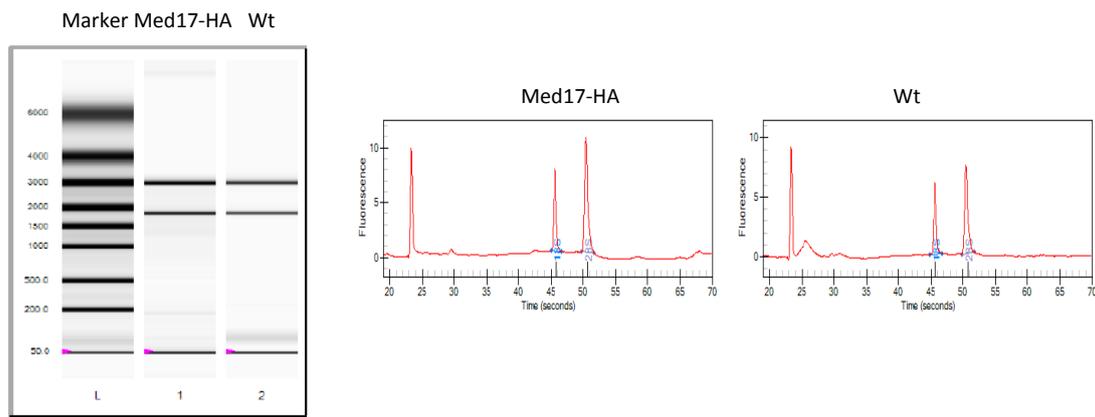
78 Proteine nur mit Rapamycin signifikant:	164 Proteine nur ohne Rapamycin signifikant:
<u>Transkriptionsfaktoren/-aktivatoren (1):</u> Cat8	<u>Transkriptionsfaktoren/-aktivatoren (7):</u> Pex19, Fzf1, Gcn4, , Mbp1, Met32, Tye7, Bdf1
<u>Ribosomale Untereinheiten (26):</u> 23 x 60S, 3x40S-Untereinheiten	<u>Ribosomalen Biogenese (11) :</u> Mdn1, Rrp3, Drs1, Dbp5/10, Nop14, Enp1, Rix1, Nep1,Noc3, Dot6
<u>Serin/Threonin Kinasen (5):</u> GCN2, BCK1, AKL1, TOR1, Kin2	<u>TFIIH (6):</u> Tfb1,2,3 Rad3, Rad25, Ccl1
<u>Ribosomalen Biogenese (9):</u> UTP4, 5, 9, 15, Nop6, RRB1, RRP14, RRS1, EFG1, DIP2	<u>TFIIIC (2):</u> Tfc1, Tfc3
<u>Nucleoporine (7):</u> NUP 57,170,188, NS1, POM152, GLE2, MLP1	<u>Importin beta(3):</u> Sxm1, Kap123, Pse1
<u>1,3-beta Glucan Synthase:</u> FSK1, GSC2	<u>Pol I – Transkription (2):</u> Hmo1, Rrn5
<u>Replikation (2):</u> Rfa1, Rfc1	<u>Chromatin Remodeling (6):</u> H2B.2, Isw1, Ioc2, Sth1; Rsc6, Rsc7
Fap1	<u>Translationsinitiation (2):</u> Gcn1, Gcd2
	Top2, Fpr3,4 (FK506-binding nuclear protein)

Tabelle 12 Auflistung ausgewählter Proteine die als signifikante Interaktionspartner des Mediatorkomplex identifiziert werden konnten -mit und ohne Inkubation von 500ng/ml Rapamycin. Eine komplette Auflistung aller Proteine, die nur mit oder ohne Behandlung mit Rapamycin signifikant sind, befindet sich im Anhang (Anhang 21) .

4.2.6 Analyse der co-präzipitierten RNA

Der Mediatorkomplex ist über seine Funktion als Co-Regulator der Transkriptionsinitiation hinaus auch in viele andere zelluläre Prozesse involviert (Carlsten et al., 2013). Auch unsere Daten zeigen, dass Mediatorkomplex mit vielen Proteinen und Proteinkomplexen assoziiert ist, deren Funktionen weit über die Initiation der Transkription hinausgehen. Viele der co-isolierten Proteine sind sowohl an der Transkription als auch an der Prozessierung der mRNA und rRNA beteiligt. Besteht eine tatsächliche Interaktion zwischen dem Mediator und all diesen Proteinen und sollte es uns durch das etablierte IP-Protokoll gelungen sein diese zu identifizieren, sollte mit diesen Proteinen auch die zu prozessierende RNA isoliert worden sein. Diese RNA wurde aus dem Eluat der Co-Immunopräzipitation mit Med17-HA und dem Kontrollstamm isoliert und im Zuge einer RNA-Sequenzierung analysiert (3.2.6.1 und 3.2.6.3). Im Zuge der RNA-Isolierung wurde das LDS-Eluat einer sauren Chloroform/Phenol-Trennung unterzogen, die Nukleinsäuren mittels Ethanol präzipitiert und der RNA und DNA Anteil der Nukleinsäuren durch eine Fluoreszenz-Analyse (QuBit®) bestimmt. Konnte keine DNA detektiert werden, wurde die RNA direkt für die Sequenzierung verwendet. Im Falle einer DNA-Kontamination wurde ein DnaseI Verdau durchgeführt und die Nukleinsäuren erneut mit Ethanol präzipitiert. Eine Größenanalyse der co-präzipitierten RNA mittels eines Bioanalyzers zeigte, dass es sich bei dem überwiegenden Anteil der präzipitierten RNA um ribosomale rRNA (18S und 28S) handelt. Zum einen ist in der Abbildung 48 A.) ist deutlich zu erkennen, dass mit sowohl über den HA-getaggten Mediator, als auch mit der Kontrolle die gleiche RNA-Spezies isoliert wurde. Die zwei Hauptbanden verlaufen bei einer Größe von ca. 1800bp und 3100bp. Dies entspricht den Größen der 25S-RNA und der 18S-RNA (www.yeastgenome.org). Die Sequenzierung ergab außerdem, dass die allermeisten Reads den Bereichen der 18S, 25S und 5.8 S-RNA zugeordnet werden konnten (siehe Anhang 16). Alle Reads, die anderen Bereichen im Genom zugeordnet werden konnten sind in Abbildung 48.B grafisch dargestellt. Auch hier ist kein Unterschied zwischen der co-isolierten RNA aus der HA-getaggter Co-IP und dem Kontrollexperiment zu erkennen.

A.)



B.)

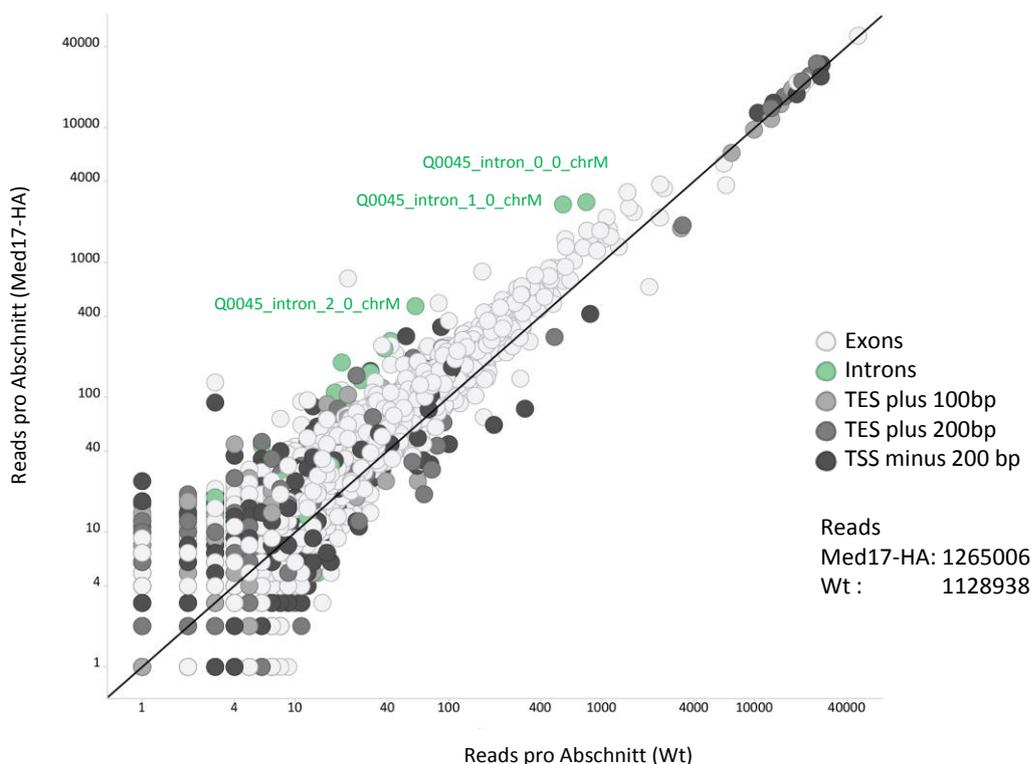
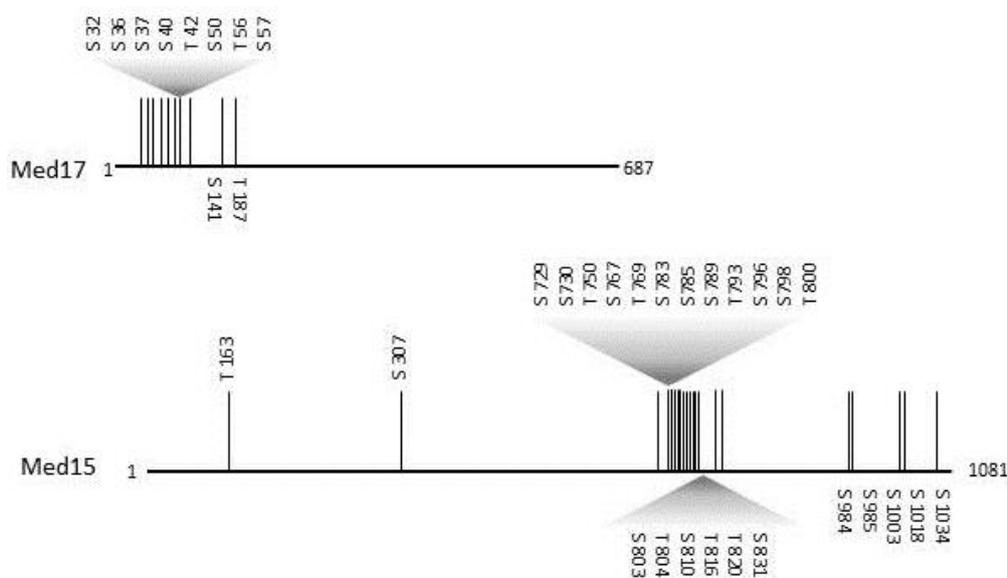


Abbildung 48 A.) Größenanalyse der co-präzipitierten RNA durch einen Bioanalyzer **B.)** Grafische Darstellung der Reads pro zugeordnetem genomischen Abschnitt. In dieser Darstellung sind die Zuordnungen für den Bereich der rDNA ausgelassen. TES-Transcription end site TSS-transcription starting site

4.3 Posttranslationale Modifikationen am Mediator-Komplex

Posttranslationale Modifikationen an Proteinen können verschiedene Auswirkungen haben. Interaktionen zwischen zwei Proteinen können gelöst werden, die Tertiärstruktur kann sich ändern oder auch enzymatische Funktionen werden aktiviert oder unterdrückt. Des Weiteren können Modifikationen zum Abbau eines Proteins führen oder diesen verhindern. Auch der Mediator-Komplex ist in seiner Funktion und Stabilität über Modifikationen reguliert (Abschnitt 1.3.1.5). Miller et al. veröffentlichte allein über 120 verschiedene Phosphorylierungen die sich auf 17 verschiedene Untereinheiten verteilen (Miller et al., 2012). Zahlreiche Studien belegen, dass der Mediator-Komplex in seiner Funktion und Zusammensetzung über Phosphorylierungen reguliert und im Zuge dessen von mehreren Kinasen angesteuert wird (Gonzalez et al., 2014; Guidi et al., 2004; Hallberg et al., 2004; Liu

lag bei den Untereinheiten zwischen 59% bis 96% und korreliert mit der Anzahl der insgesamt detektierten Peptide je Untereinheit. Diese Unterschiede erklären sich zum einen durch die geringe Größe einiger Untereinheiten (z.B. Med31 (15kDa) und Med11 (13kDa)) aber auch durch die Substöchiometrie des Kinasemodules. Außerdem kommt es gerade bei repetitiven Sequenzen vor, dass die Peptide nicht dem richtigen Bereich zugeordnet werden können, diese finden sich vor allem in Untereinheiten des Schwanzmodules. Insgesamt konnten 92 verschiedene Phosphorylierungen detektiert werden die sich auf 14 Untereinheiten aufteilen (siehe Tabelle 13). Eine grafische und tabellarische Darstellung der Verteilung aller Phosphorylierungen für jede Untereinheit befindet sich im Anhang. (Anhang 17 und Anhang 18). Von diesen wurden 51 schon durch Miller et al. publiziert, 41 Positionen sind jedoch neu. Viele der neu detektierten befinden auf dem mittleren Bereich der Untereinheit Med13 des Kinasemoduls und am N-Terminus der Untereinheiten Med17 und Med3. Dabei verteilen sich die Phosphorylierungen nicht gleichmäßig über die Proteine, sondern sind in Clustern zusammengefasst. Diese Cluster sind vor allem am C-Terminus der Untereinheit Med15 sehr stark ausgeprägt und spielen vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Interaktion zwischen Schwanzmodul und Aktivatoren (Miller et al., 2012). Auch in unseren Daten sind diese Cluster zu erkennen. Des Weiteren zeigt sich ein solches Cluster auch am N-terminalen Bereich von Med17 (Abbildung 50). Ob dieses Cluster eventuell eine Rolle bei der Transkriptionsregulation spielt, lässt sich nur vermuten. Tatsache ist, dass die Interaktion zwischen Med17 und der CTD der Polymerase II über den mittleren Bereich von Med17 (AS 212-AS 246) erfolgt (Robinson et al., 2012). Hier konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Phosphorylierungen detektiert werden.



Mediator Untereinheit	Publizierte Phosphorylierungen (Miller et al., 2012)	Identifizierte Phosphorylierungen		Sequenz- abdeckung (%)	Normalisierte Peptidanzahl
			Davon neu		
Med 1	15	4	0	89	439
Med 2	6	4	2	71	286
Med 3	5	8	7	93	607
Med 4	10	7	0	94	656
Med 5	13	11	5	92	642
Med 6	11	3	0	96	510
Med 7	4	1	1	87	534
Med 8	2	-		91	566
Med 9	2	-		92	474
Med 10	3	-		84	388
Med 11	-	-		61	116
Med 13	5	11	10	64	146
Med 14	6	4	1	83	479
Med 15	32	25	3	83	394
Med 16	-	4	4	89	609
Med 17	2	10	8	94	740
Med 18	1	-		84	526
Med 19	8	2	0	89	492
Med 31	1	1	0	59	122

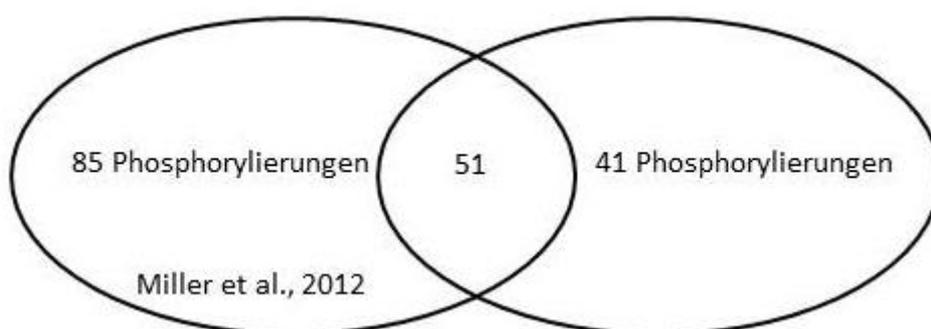


Tabelle 13 Zusammenfassung der identifizierten Phosphorylierungsstellen im Vergleich zu den durch Miller et al., 2012 publizierten. Abbildung unten: Venn-Diagramm aller Phosphorylierungspositionen die aus unseren Daten mit Peaks identifiziert wurden und den von Miller et. al publizierten.

Im Zuge der Datenanalyse durch die Software Peaks Studio wurden nicht nur nach Phosphorylierungen, sondern auch nach Acetylierungen und Methylierungen gesucht. Es stellte sich jedoch heraus, dass nur stark vereinzelt Peptide des Mediators eine dieser Modifikationen aufwiesen. Wie jedoch schon im Abschnitt 4.2.4.1 angesprochen, konnte das Ubiquitin-ähnliche Protein Smt3 als Modifikation identifiziert werden. Das dem Ubiquitin sehr ähnliche Protein spielt eine wichtige Rolle innerhalb verschiedenster Prozess und konnte mit einer 72%igen Sequenzabdeckung identifiziert werden (Abbildung 51). Innerhalb der Zelle ist es kovalent über den eigenen C-Terminus mit dem Lysinrest des Targetproteins verlinkt (Johnson, 2004). Wie in Abbildung 51 zu erkennen ist, fehlen Peptide des C-Terminus. Das ergibt sich aus der Tatsache, dass nach dem Trypsinverdau des SUMO-modifizierten Proteins ein Peptid entstanden sein muss, welches den C-Terminus des SMT3 und einen Bereich des modifizierten Proteins umfasst und nicht mehr nur dem C-Terminus entspricht. Nun ist es theoretisch möglich, die C-terminale Smt3-Sequenz EGIGGATY als Modifikation für Lysinreste in die Datenanalyse einzubauen. Dann würden auch Peptide aus den MS/MS-Daten errechnet werden, die zusätzlich zu ihrer Peptid Sequenz eine solche Modifikation enthalten. Leider ergab die Datenanalyse diesbezüglich keine Ergebnisse und es konnte nicht geklärt werden, welche der co-isolierten Untereinheit/en mit SMT modifiziert war.



Abbildung 51 Sequenzabdeckung des mit Med17-HA co-isolierten SMT3 Proteins (SUMO). P-Phosphorylierung, O-Oxidation, a-Acetylierung, d-Deamidierung

Diskussion und Zusammenfassung

Der Mediator-Komplex reguliert die Transkription fast aller Polymerase II abhängiger Gene. Wie eine Brücke verknüpft er DNA-bindende Transkriptionsfaktoren an stromaufwärts liegenden regulatorischen Sequenzen mit der Polymerase II (Conaway and Conaway, 2011). Durch die Assoziation des Mediator-Komplexes mit den Aktivierungsdomänen der DNA-gebundenen Transkriptionsaktivatoren stellt er eine Plattform für die Ausbildung des Pre-Initiationskomplexes dar, die es ermöglicht die Transkription dieser Gene gezielt zu regulieren. Diese Regulation beinhaltet im Kern die Aktivierung, Repression und auch die Aufrechterhaltung konstitutiven Transkription Protein-codierender Gene. Seine Größe, flexible Struktur und auch variable Zusammensetzung ermöglichen es zudem viele weitere Prozesse die untrennbar mit der Transkription verbunden sind, zu koordinieren. So ist er sowohl an der Organisation der genomischen DNA als auch an fast allen weiteren Prozessen der Transkription beteiligt. Dabei fällt sein Einfluss auf verschiedene Gene recht unterschiedlich aus (Holstege et al., 1998; Paul et al., 2015). Fehlen auf Grund des experimentellen Designs (z.B. „Konock Out“) Untereinheiten hat das meist keinen Effekt auf die Transkription aller Gene, sondern nur auf bestimmte Gengruppen. Nur die Inaktivierung der Untereinheiten Srb4 und Srb6 beeinflusst die Transkription aller Polymerase II-abhängiger Gene (Holstege et al., 1998; Myers and Kornberg, 2000b). Die Darstellung und Untersuchung des Mediator-Komplexes innerhalb dieser vielfältigen Funktionen ist der Fokus unzähliger wissenschaftlicher Anstrengungen der letzten Jahre. Mit dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal die Komplexität des Aufgabenspektrums durch die bisher umfassendste Interaktomanalyse einzelner Untereinheiten darzustellen. Die Ergebnisse bestätigen nicht nur viele Interaktionen (Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006) sondern geben auf Grund der Vielzahl der signifikanten Interaktionspartner einen Eindruck darüber ab, wie unglaublich komplex und heterogen der Prozess der Transkription gestaltet ist.

5.1 Ein Protokoll zur umfassendsten Isolierung des Mediator-Interaktoms konnte etabliert werden

Diese Arbeit hatte zum Ziel den Mediator-Komplex innerhalb seiner vielfältigen Funktionen so vollständig wie möglich zu isolieren und zu analysieren. Eine Co-Immunopräzipitation des Mediators und aller mit ihm assoziierten Interaktionspartner in Verbindung mit der Analyse dieser mittels Massenspektrometrie, stellt eine bewährte Kombination zweier gut etablierter Methoden für die Erforschung von Protein-Interaktionsnetzwerken dar ((Babu et al., 2012; Doerr, 2012; Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006). Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Protokoll wurde mit Hinblick darauf optimiert, auch schwach und substöchiometrisch bindende Interaktionspartner des Mediators während der Co-IP zu isolieren. Die Gefahr dabei besteht jedoch darin, dass unspezifisch bindende Proteine nicht ausreichend von den Beads entfernt werden können. Um diese von den spezifischen Interaktionspartnern des getaggtten Proteins zu unterscheiden wurde für jede einzelne IP parallel eine Kontroll-IP ohne getaggtten Mediator durchgeführt. Eine einfaches *Labelfree* Experiment, im Rahmen dessen zwei MS-Datensätze miteinander verglichen werden (siehe auch Abschnitt 1.1.2) kam nicht in Frage, da das Protokoll trotz intensiven Bemühungen es so kurz wie möglich zu halten, viele Einzelschritte beinhaltet, die eine exakte Reproduzierbarkeit unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde das metabolische Markieren der Wildtyp-Kontrolle durch die ¹⁵N-markiertes Ammoniumsulfat verwendet. Die unterschiedlich markierten Proben können gemischt als eine aufbereitet werden, da die Markierung eine Unterscheidung zwischen „Bait-IP“ und Kontroll-IP auf MS-Ebene erlaubt. Je früher sie gemischt werden, umso mehr verringert sich der Einfluss von Ungenauigkeiten, die bei paralleler Probenaufbereitung auftreten (siehe Anhang 2). Da die Zellen auf Grund der hohen Austauschrate der Interaktionspartner nicht direkt nach der Ernte vereint werden konnten, geschah die Zusammenführung der Bait-IP und der Wt-IP nach der Elution der Proteine von den magnetischen Beads. Dadurch konnte zumindest ab diesem Zeitpunkt der Fehler der parallelen Probenaufbereitung aus dem Gel und der parallelen MS Messung vermieden werden.

Die Wahl der Aufschlussmethode stellte sich als eine entscheidende Hürde heraus. Der Aufschluss sollte zum einen die Zellwand durchbrechen aber gleichzeitig große Proteinkomplexe aber intakt lassen. Des Weiteren sollte der Einsatz von Detergenz weitestgehend vermieden werden, um keine Interaktionspartner zu verlieren. Da der Mediatorkomplex in Hefe ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist (Huh et al., 2003), ist der Einsatz von Membran-solubilisierenden Detergenzien bei einem Zellaufschluss eigentlich unumgänglich. Die Verwendung des Kryogrinding mit der Planetenmühle als Aufschlussmethode war demzufolge ein Schlüsselement der Methodenetablierung, da es uns diese Methode ermöglichte die Zellen sehr effektiv aufzuschließen und gleichzeitig auf Detergenzien weitestgehend verzichten zu können. Weiterhin war es mit dieser Aufschlussmethode möglich die bei einem Aufschluss mit Glaskügelchen entstehende Reibungswärme und die damit verbundene Proteindegradation zu vermeiden. Neben der geringen Menge an Detergenz waren auch die hohen Salzkonzentrationen ein erfolgsbringender Faktor. Mit der Verwendung von 300mM Kaliumacetat im Lysepuffer konnte gewährleistet werden, dass sich vermehrt DNA-assoziierte Proteine von der DNA lösen. Dadurch gingen sie während des Zentrifugationsschrittes nach dem Homogenisieren nicht verloren (Søgaard and Svejstrup, 2007). Auch eine Publikation von Chereji et al zeigt, dass sich durch den Einsatz von hohen Salzkonzentrationen von bis zu 500mM auch die chromatingebundene Fraktion des Mediatorkomplexes in Hefezellen analysieren lässt (Chereji et al., 2017).

Durch all diese Optimierung des Protokolls gelang es über 450 spezifische Interaktionspartner allein durch die HA-getaggte Untereinheit Med17 zu identifizieren (Uthe et al., 2017). Darunter fast 400 Interaktionspartner, die im Rahmen anderer Analysen unter anderen IP-Bedingungen nicht gefunden werden konnten. Nur 65 dieser Proteine sind bisher in der Hit-Predict Datenbank als Interaktionspartner gelistet. So konnte zum Beispiel der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIIF während einer Co-IP mit Med18 im Labor von Steven Hahn nicht identifiziert werden (Rani et al., 2004) während die Untereinheiten Tf2a und Tf2b in unseren Daten zu den signifikantesten und abundantesten Interaktionspartnern gehören.

Um ein umfassendes Bild der Interaktoms des Mediators zu erhalten wurden von allen 4 Modulen Untereinheiten C-terminal mit Hämagglutinin fusioniert und es gelang mit dem etablierten Protokoll mehrere Hundert spezifische Interaktionspartner zu identifizieren. Dabei wurde deutlich, dass die Position des Proteintags eine wesentliche Rolle für die Optimierung der Co-IP spielte. So konnten mit den Untereinheiten Med17 und Med5 deutlich mehr Proteine als signifikante Interaktionspartner identifiziert werden, als mit den getaggtten Untereinheiten Med1, Med2 und Med19 (siehe Anhang 8, Anhang 9 und Anhang 10). Möglicherweise ist die Zugänglichkeit des Affinitätstags am C-Terminus dieser Proteine für den Antikörper weniger optimal. Wurde am Anfang noch davon ausgegangen, dass die Untereinheiten verschiedener Module auch verschiedene Interaktome aufweisen, mussten wir feststellen, dass mit allen Untereinheiten im Wesentlichen die gleichen Proteine co-isoliert werden konnten, dazu zählen die RNA-Polymerase II, Transkriptionsaktivatoren, alle Komplexe des Pre-Initiationskomplexes und des *Chromatin Remodelings*. Die verschiedenen Interaktome unterschieden sich darin, wie vollständig die co-isolierten Komplexe waren. Ein wesentlicher Unterschied bestand jedoch in der signifikanten Anreicherung der Polymerase I, dem RENT Komplex und Proteinen die an der rRNA Prozessierung und der Ribosomen Biogenese beteiligt sind. Dies gelang signifikant nur mit den Untereinheiten Med5 und Med17. Da beide Untereinheiten zu unterschiedlichen Modulen gehören (Med5-Schwanz, Med17-Kopf) und innerhalb des Mediatorkomplexes auch nicht nebeneinander positioniert sind (Dotson et al., 2000; Tsai et al., 2014), lässt sich eine modulspezifische Funktionalität bezüglich der Transkriptionsregulation der RNA- Polymerase I ausschließen. Des Weiteren ist auffällig, dass über 200 Proteine nur im Experiment mit Med5-HA als signifikant identifiziert werden konnten. Dabei handelt es sich um Proteine der Ribosomen Biogenese, rRNA-Prozessierung und aus dem Nukleus, aber auch um viele rein cytosolische, die metabolischen Prozessen zugeordnet werden können und Proteine aus dem Mitochondrium (siehe Anhang 7). Da solche Proteine mit der anderen HA-getaggtten Untereinheit des Schwanzmoduls Med2 nicht identifiziert wurden, ist diese Beobachtung nicht spezifisch für das Schwanzmodul. Eine Erklärung für diese

Beobachtung, könnte jedoch der zellbiologische Einfluss des Hämagglutinintags am C-Terminus der Untereinheit Med5 sein. Wie in Bevè et al gezeigt werden konnte, führt ein Verlust der Untereinheit Med5 in Hefezellen, die in Minimalmedium wachsen, zu einer Zunahme der Genexpression kerncodierter mitochondrialer Proteine der Atmungskette (Béve et al., 2005). Sollte die C-terminale Fusion mit dem HA-Tag die Funktionalität der Untereinheit Med5 in diesem Zusammenhang beeinflussen, ist es möglich, dass sich die Genexpression dieser Gene im Stamm Med5-HA von der im Kontrollstamm unterscheidet und damit auch der unspezifische Hintergrund verändert. Sollte es einen solchen Effekt gegeben haben, war dieser nicht an Hand einer signifikant veränderten Wachstumsrate dieses Stammes zu erkennen (siehe Anhang 1).

5.2 Der Mediator-Kernkomplex ist nicht flexibel zusammengesetzt

Der Mediator-Kernkomplex liegt in mindestens 3 verschiedenen Formen vor (Conaway and Conaway, 1993; Liu et al., 2001): als freier Mediator ohne Kinase-Modul (Kernmediator), als freier oder über Transkriptionsfaktoren an die DNA-gebundener Mediator mit Kinase-Modul (Petrenko et al., 2016; Yudkovsky et al., 2000)) und als Kernkomplex assoziiert mit der Polymerase II innerhalb des Pre-Initiationskomplexes. In unseren Daten konnten wir mit Hilfe des IBAQ –Wertes die Stöchiometrie dieser drei Zustandsformen abschätzen. Wird die Co-IP mit dem HA-getaggten Kernmodul (Med17-HA) durchgeführt, werden alle 3 Formen in einer Mischung isoliert. Da sich die Interaktion des Mediators mit dem Kinase-Modul oder der Polymerase II untereinander ausschließen lassen (Tsai et al., 2013) lässt sich entsprechend der Abbildung 31 abschätzen, dass der Mediator-Kernkomplex etwa zu 15% mit dem Kinase-Modul assoziiert ist, zu weiteren 15% mit der Polymerase II und ca. 70% des isolierten Mediator-Kernkomplex nur als Kernmediator vorliegt. Ob es sich dabei um den wirklichen physiologischen Zustand handelt lässt sich aus unseren Daten nicht eindeutig entnehmen. Es ist ebenso möglich, dass die Komplexe während der IP teilweise auseinandergefallen und die Stöchiometrie zwischen Mediator-Kernkomplex und der Polymerase II bzw. dem Kinase-Modul in vivo ganz anders verteilt ist. Außerdem ist an dieser Stelle anzumerken, dass es sich dabei um eine gemischte Stöchiometrie handelt, da die Zellen aus denen der Mediator gewonnen wurde in unterschiedlichen Altersstadien vorlagen.

Isoliert man den Mediator-Kernkomplex über das Kinase-Modul Abbildung 38 zeigt sich, dass die Untereinheiten des Kernmediators in einem zumindest ähnlichen Verhältnis zur getaggten Untereinheit Srb9 isoliert werden konnten, wie die anderen 3 Untereinheiten des Kinase-Moduls. Das weist darauf hin, dass nur ein kleiner Anteil des Kinase-Moduls physiologisch oder artifiziell ungebunden isoliert werden konnte. Wäre die Interaktion zwischen Cdk8-Module und-Mediator also nicht stabil genug, die IP zu überdauern oder würde das Kinase-Modul auch in großen Mengen separat in der Zelle vorliegen, dann müsste sich das Kinase-Modul in der Abbildung 38 stöchiometrisch von den Untereinheiten Kernmediator abheben. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Cdk8-Mediator-Kernkomplex die Aufreinigung weitestgehend stabil überstanden hat, was bei der Co-IP über die HA-getaggte Untereinheit des Mittelmoduls ebenso der Fall gewesen sein muss. Demzufolge könnten 15% Cdk8-Mediator Anteil durchaus dem physiologischen Anteil entsprechen. Die Abschätzung für die Stöchiometrie der Mediator-Polymerase II Interaktion entsprechen den Beobachtungen des Labors von Steven Hahn: Ca. 10% (Takagi et al., 2005) bis 20% (Rani et al., 2004) des Mediator-Kernkomplexes sind mit der Polymerase II assoziiert.

Der menschliche Mediator-Kernkomplex besitzt im Gegensatz zum Hefekomplex, Untereinheiten, die nicht fest assoziiert sind auch unabhängig vom Kernmediator agieren können (Malik et al., 2005; Taatjes und Tjian, 2004). Viele Untereinheiten des Mediator-Kernkomplex sind zudem sehr klein und können unter Umständen im Zuge der Aufreinigung verlorengehen (Chereji et al., 2017; Liu et al., 2001). Mit dem hier diskutierten Protokoll gelang es mit jeder HA-fusionierten Mediator-Untereinheit alle anderen 24 zu isolieren. Inwiefern der Mediator flexibel zusammengesetzt ist, stellte sich im Rahmen des PAM-Experimentes dar. Eine stark-transiente Interaktion konnte in dem Zusammenhang nur für die

Untereinheiten des Kinaseomodul festgestellt werden, was schon ausführlich in der Literatur beschrieben wurde (Borggreffe et al., 2002; Tsai et al., 2013; Wang et al., 2013). Im Rahmen des PAM-Experiments, konnte außerdem festgestellt werden, dass die 4 Untereinheiten des Kinaseomoduls in sich eine stabile Einheit bilden (Siehe Anhang 11).

Des Weiteren ließ sich jedoch in den Daten des PAM-Experimentes erkennen, dass die Untereinheiten Med2, Med3 und Med15 eine stärkere Kinetik aufweisen als die anderen Untereinheiten des Kernkomplexes. In der Literatur finden sich viele Hinweise darauf, dass diese Untereinheiten ein Submodul bilden, welches unabhängig vom Rest des Kernmediator mit den Transkriptionsaktivatoren interagieren und auch die Ausbildung des Pre-Initiationskomplexes auslösen kann (Anandhakumar et al., 2016; Ansari and Morse, 2012; Lewis and Reinberg, 2003). Das Interaktom der analysierte Untereinheit Med2 wies jedoch keine Proteine auf, die einzigartig für diese Untereinheit wären. In diesem Datensatz konnte auch nicht gezeigt werden, dass sich ein solches Submodul stöchiometrisch absetzt. Sollte es wirklich ein autonomes Modul aus den Untereinheiten Med2, 3 und 15 geben, so existiert es höchstwahrscheinlich substöchiometrisch zum Kernmediator.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass der Mediatorkernkomplex ein stabiler Proteinkomplex aus 21 Untereinheiten ist. Die 4 Untereinheiten des Kinaseomoduls bilden eine eigenen Komplex und sind transient assoziiert.

5.3 Das Kinaseomodul ist nicht an der aktiven Transkription beteiligt

Das Kinaseomodul ist in menschlichen Zellen an manchen Promotoren auch während der Transkription am Mediator assoziiert (Wang et al., 2005). Auch in Hefe gibt es Hinweise darauf, dass das Kinaseomodul auch an der Transkriptionsaktivierung beteiligt ist (Larschan and Winston, 2005; Shahi et al., 2010). Diese Beteiligung beschränkt sich jedoch auf die die PIC-Assemblierung (Larschan and Winston, 2005) oder die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Nelson et al., 2003). Unsere Ergebnisse deuten wie viele andere Publikationen (Elmlund et al., 2006; Myers et al., 1998; Tsai et al., 2013) darauf hin, dass der Mediatorkernkomplex entweder mit dem Kinaseomodul oder mit der Polymerase II interagiert. Der über Srb9-HA isolierte Mediatorkomplex ist nicht mit der Polymerase II oder einer anderen Polymerase assoziiert und auch nicht mit Proteinen des Pre-Initiationskomplexes. Das zeigt, dass es kein stabiles Zwischenstadium gibt, in dem der Mediatorkomplex mit der Polymerase II und dem Kinaseomodul verbunden ist. Unsere Daten zeigen, dass die Assoziation des Kinaseomoduls mit dem Kernmediator nicht mit aktiver Transkription verbunden ist.

5.4 Der Mediator ist Bestandteil des Pre-Initiationskomplexes

Im Rahmen der Interaktomanalyse konnte die Rolle des Mediatorkomplexes als Aktivator-abhängiger Initiator des Pre-Initiationskomplexes gezeigt werden. Es gelang alle allgemeinen Transkriptionsfaktoren und die Polymerase II, welche zusammen mit dem Mediator den PIC bilden, zu isolieren. Unsere Daten zeigen zudem, dass die Interaktion zwischen Mediator und den Untereinheiten der Polymerase II insoweit stabil ist, dass circa 15% des Mediators im Komplex mit der Polymerase II vorliegt. Die Vermutung liegt nahe, dass dies auch dem Anteil des Mediators innerhalb des PIC entspricht, zumal die allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIF, TFIIB und Taf14 (TFIID) dieselbe Stöchiometrie zum Mediator aufweisen wie die Polymerase II. Dem entgegen steht das von Jeronimo et al vorgeschlagen Model der Transkriptionsinitiation, in dem der Mediatorkomplex nur an den UAS Sequenzen über das Schwanzmodul assoziiert ist und nicht stabil am Kernpromotor über die allgemeinen Transkriptionsfaktoren bindet (Jeronimo and Robert, 2014; Jeronimo et al., 2016). Die Interaktion innerhalb des Pre-Initiationskomplexes ist demnach ein instabiles Zwischenstadium. Eine Akkumulation des Mediators am Promotorbereich kann nur künstlich durch die Inaktivierung der Kin28-Kinaseaktivität erzeugt werden. Dann verschiebt sich in Chip-Experimenten, der Mediatorpeak vom Bereich der UAS zum Kernpromotor und überlappt mit dem Bereich, an den die Polymerase II bindet (Abbildung 52). Dies würde bedeuten, dass die Interaktion zwischen Mediator und Polymerase

II per se zwar stabil (Harper and Taatjes, 2017) aber innerhalb des Transkriptionsprozesses *in vivo* sehr instabil oder kurzlebig ist. Wie war es dann überhaupt möglich die Polymerase assoziiert am Mediator zu co-isolieren (Liu et al., 2001; Robinson et al., 2016)?

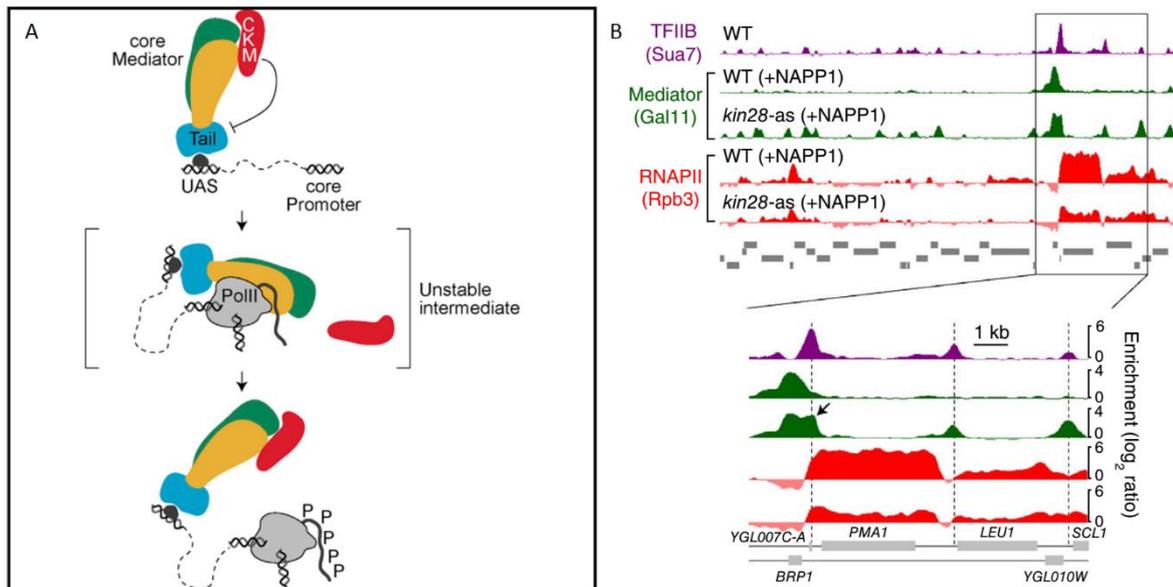


Abbildung 52 A.) Grafische Darstellung der dynamischen Assoziation des Mediators mit Hefegenen. Der Mediator wird zu den Upstream Activating Sequences über die dort gebundenen Transkriptionsaktivatoren rekrutiert. Dort stimuliert er die Assemblierung des Pre-Initiationskomplexes. Dieser Komplex ist sehr instabil und zerfällt nach der Phosphorylierung der C-Terminale Domäne über die Kinase Kin28 wieder. B.) Durch eine Deletion der Kin28-Aktivität akkumuliert der Mediator am Promotor. Dargestellt ist ein ChIP-Experiment in Wildtypzellen und einer Kin28-Mutante. In Wildtypzellen okkupiert der Mediator (grün) den Bereich vor dem Kernpromotor und überlappt nicht mit dem Bereich der DNA, mit dem die Polymerase II (lila) verlinkt wurde – dem Kernpromotor (Abbildungen nach Jeronimo and Robert, 2014 und Jeronimo et al., 2016).

Eine mögliche Erklärung liegt in der Tatsache begründet, dass die Experimente mit Zellen vorgenommen wurden, die sich in verschiedenen Wachstumsphasen befanden und nicht synchronisiert waren. Auf Grund der großen Vorkulturmengen, befand sich ein gewisser Anteil der Hauptkultur auch bei einer gesamten OD₆₀₀ von 0.7-0.8 schon der stationären Phase (*quiescence*). Auch geringe Mengen an Nährstoffen, in diesem Fall an Ammoniumsulfat können dazu führen, dass Zellen sich in diese Phase begeben (Manginot et al., 1998). In der Arbeitsgruppe Holstege konnte gezeigt werden, dass in dieser Phase des Zellzyklus die Polymerase II vermehrt oberhalb des Promoters lokalisiert ist, zusammen mit dem TATA-Box-Bindeprotein und dem Mediator (Radonjic et al., 2005). Dies ermöglicht den Zellen eine schnelle Reaktion auf eventuelle Umweltänderungen, die aus dieser Phase herausführen. Möglicherweise ist nur in diesem Zellzustand die Interaktion so stabil, dass sie eine Immunopräzipitation überdauert. Eine andere Erklärung findet sich in der Überlegung, dass es sich der beobachteten Interaktion um eine DNA vermittelte handelt. Dem entspricht die Beobachtung, dass bei Verwendung von Benzonase die Affinität der Polymerase II zum Mediator leicht abnimmt (siehe Abbildung 40). Für die Problematik der DNA-vermittelten Interaktionspartner lässt sich an dieser Stelle sagen, dass nicht eindeutig zwischen diesen und Protein-Protein Interaktionen unterschieden werden kann. Auch bei der Verwendung der Benzonase ist auf Grund der suboptimalen Reaktionsbedingungen (hoher Salzgehalt und niedrige Temperaturen) nicht komplett auszuschließen, dass nur ein Teil der Nukleotidbrücken verdaut wurde, zumal viele Bereiche der DNA und RNA im Rahmen der Transkription mit Proteinen bedeckt sind und den Zugang der Nuklease verhindern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Bestandteile des Pre-Initiationskomplexes über Untereinheiten des Mediators co-isoliert wurden. Es handelt sich dabei mit großer Wahrscheinlichkeit aber um eine Mischung aus vielen mehr oder weniger intakten Komplexen aus unterschiedlichen

Stadien der Transkription. Zusätzlich kann es sich dabei um frei lösliche oder DNA-assoziierte Komplexe handeln. Im Rahmen dieser Arbeit können diese jedoch nicht voneinander unterschieden werden.

5.5 Der Mediatorkomplex ist an der Transkriptionselongation beteiligt

Neben den vielen Proteinen, die in die Transkriptionsinitiation involviert sind, konnten auch signifikante Interaktionspartner identifiziert werden, die sowohl für die Elongation als auch die Modifikation und den Transport der mRNA verantwortlich sind. So wurden Proteine als Interaktionspartner detektiert, die am Spleißen und der mRNA-Prozessierung wie deren Abbau beteiligt sind. Den Vorgang des Spleißens beobachtet man in Hefe vorrangig bei der Transkription ribosomaler Protein-Gene (Spingola et al., 1999b). CHIP-Analysen aber zeigen, dass der Mediator an diesen Genen nicht assoziiert ist (Ansari et al., 2009; Fan et al., 2006; Jeronimo and Robert, 2014). Andere Analysen mit ChEC-seq (*Chromatin endogenous cleavage*) dagegen weisen darauf hin, dass der Mediator oberhalb der Promotoren für ribosomale Proteine angereichert ist (Grünberg and Zentner, 2017), aber wahrscheinlich mit einer höheren Dynamik an diese bindet und durch herkömmliche CHIP-Methoden nicht zu detektieren war. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch das Entfernen der Untereinheiten Med17 und Med18 durch *Anchor Away* die Assemblierung des PIC's an diesen Genen enorm reduziert ist (Jeronimo and Robert, 2014). Um weitere Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob der Mediator an diesen Genen auch am Prozess des Spleißens beteiligt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, unprozessierte mRNA über den Mediator zu co-isolieren. Erste Analysen der RNA ergaben jedoch keine Hinweise darauf, was aber dem noch unausgereiften Protokoll geschuldet sein mag.

5.6 Der Mediatorkomplex interagiert mit der Polymerase I und III

Das wohl überraschendste Ergebnis der Interaktomanalyse war die signifikante Anreicherung aller Untereinheiten der Polymerase I und einiger Untereinheiten der Polymerase III. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die Rolle des Mediators möglicherweise alle Arten der Transkription umfasst. Doch im Gegensatz zur Polymerase II konnten nur wenige allgemeine Transkriptionsfaktoren dieser beiden Polymerasen identifiziert werden. Als signifikantester und auch stabilerer Interaktionspartner des Mediators in diesem Zusammenhang stellte sich der RENT-Komplex heraus. Dieser und das Protein Hmo1 weisen die selbe Stöchiometrie zum Mediator auf, wie die beiden großen Untereinheiten der Polymerase I. Im Gegensatz zu Ihnen verändern sie jedoch nicht ihre Affinität beim Einsatz von Benzonase oder bei der Verwendung von mehr Detergenz. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen Mediatorkomplex und RENT-Komplex auch bei höheren Detergenzkonzentrationen noch stabil und wahrscheinlich nicht DNA-vermittelt ist. Ein Kontrollexperiment, in dem sich beantworten lässt, dass der Mediator über den HA-getaggten RENT-komplex isoliert werden kann, wurde jedoch nicht durchgeführt. Auch von der Polymerase III konnten einige Untereinheiten als wenig abundant aber signifikante Interaktionspartner identifiziert werden. Im Gegensatz zu den Untereinheiten der Polymerase I, bleiben sie jedoch auch bei Verwendung von Detergenz und Benzonase signifikant. In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise darauf, dass der Mediatorkomplex mit allen 3 Polymerasen interagiert. Im Rahmen einiger CHIP-Analysen wurde der Mediatorkomplex sowohl an Genen für ribosomale RNA (Fan and Struhl, 2009) als auch für tRNA (Chereji et al., 2017; Paul et al., 2015) detektiert. In diesen Publikationen wird jedoch eindeutig darauf hingewiesen, dass diese genomischen Bereiche auf Grund ihrer stark erhöhten transkriptionalen Aktivität zu ChiP-Artefakten führen können, da die DNA an diesen Stellen von nur wenigen Proteinen bedeckt ist.

Obwohl so viele rRNA prozessierende Proteine als signifikante Interaktionspartner isoliert wurden, erbrachte die Analyse der Co-präzipitierten RNA keinerlei Hinweise darauf, dass es sich dabei um unprozessierte rRNA oder tRNA handeln könnte. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass der Mediatorkomplex im Zusammenhang mit der Polymerase I eine Rolle außerhalb der Transkriptionsinitiation spielt. Dafür spricht beispielsweise die stabile Interaktion mit dem RENT-Komplex, welcher auch für die Stilllegung von rDNA-Bereichen verantwortlich ist (Straight et al., 1999).

5.7 Der Mediator als Transkriptionsplattform

Die Funktionalität des Mediator Komplexes ist nicht auf die des Co-Regulator der Transkription Pol II-abhängiger Gene beschränkt. Die Hinweise in der Literatur zu dieser Aussage mehren sich (Malik and Roeder, 2010) und auch die Daten dieser Arbeit zeigen, dass das Interaktom des Mediator Komplexes weit aus vielseitiger ist, als das ihm bisher zugeschriebene Funktionsspektrum. Dabei zeigte sich, dass dieses Interaktom über eine hohe Dynamik verfügt, ständig ausgetauscht wird und auf äußere Faktoren reagiert. Diese Daten stehen im Konsens damit, dass sich der Mediator Komplex durch seine flexible Struktur, seine variable Zusammensetzung und seine vielen Modifikationsmöglichkeiten als zentrale Plattform der Transkription eignet (Allen and Taatjes, 2015). Da es uns möglich war so viele Bereiche der Transkription durch die identifizierten Interaktionspartner des Mediators abzudecken, gehen wir davon aus, dass er die Funktion der Transkriptionsplattform, sondern auch in *Saccharomyces Cerevisiae* wahrnimmt.

Das Modell der Transkription hat sich zudem in den letzten zwei Jahrzehnten weiterentwickelt und geht zunehmend von der Lehrbuchvorstellung weg, in der die Polymerase II ausschließlich wie ein Zug auf Schienen aus DNA entlanggleitet (Alberts and Lodish, 1994; Miller and Hamkalo, 1972). Diese Vorstellung erscheint umso unrealistischer, wenn man bedenkt, wie viele große andere Proteinkomplexe neben der Polymerase II selbst am Prozess der Elongation beteiligt sind, damit die Transkription, die Prozessierung der mRNA und das dazugehörige *Chromatin-Remodeling* zeitgleich stattfinden können. Es mag wohl eher der Fall vorliegen, dass die Polymerase II über die vielen Proteininteraktionen relativ wenig Bewegungsgrade besitzt und die DNA der mobile Part ist und durch diese riesigen Transkriptionsmaschinerien durchgeführt wird und dabei rotiert (Cook, 1999; Iborra et al., 1996). Dass die Transkription auch dann stattfindet, wenn die Polymerase II fixiert wird, ist schon hinreichend gezeigt worden (Schafer et al., 1991; Wang et al., 1998). Zudem mehren sich die Hinweise darauf, dass die Transkriptionsaktivität im Zellkern gut strukturiert ist und aktives Chromatin so organisiert wird, dass im Zellkern gewisse Substrukturen entstehen. Das bekannteste Beispiel dafür ist der Nukleolus, in dem hauptsächlich die Transkription der rDNA stattfindet. Eine andere Organisationsform die schon seit Beginn des Jahrtausends immer wieder heftig diskutiert wird, sind die sogenannten Transkriptionsfabriken -*transcription factories* (Jackson et al., 1993). Jackson und Kollegen gelang es durch konfokale Mikroskopie und dem Markieren nascenter mRNA durch Bromouridin-5'-Triphosphat in HeLa-Zellen zu zeigen, dass Transkription nicht gleichmäßig verteilt im Zellkern stattfindet, sondern innerhalb mehrerer hundert diskreter Stellen. Diese Stellen nannte man Transkriptionsfabriken. Sie bestehen je nach Zelltyp und Polymerase (I, II oder III) aus 2-30 Transkriptionseinheiten, also der Summe der Faktoren, die für die Transkription eines Gens nötig sind (Cook, 2010). All diese Megakomplexe organisieren sich so, dass ein proteinreicher Kern entsteht auf dem die Polymerasen auf der Oberfläche lokalisiert sind (siehe Abbildung 53). Eine Proteomanalyse dieser Substrukturen im Zellkern zeigte, dass sich die Transkriptionsfabriken der jeweiligen Polymerase voneinander abtrennen lassen und eine spezifische Zusammensetzung haben (Melnik et al., 2011). Sie bestehen aus mehreren hundert Proteinen, wobei sich neben den Polymerase-spezifischen Transkriptionsfaktoren, vielen RNA Helikasen und Histonen vor allem Strukturproteine wie Spectrin und Nucleophosmin fanden. Die Transkriptionsfabriken scheinen zusätzlich sehr dynamisch aufgebaut zu sein; da die RNA-Polymerase und auch andere Komponenten kontinuierlich binden und wieder ab dissoziieren (Kimura et al., 2002). In diesem Model bleibt die Position der Fabrik stabil, während das Chromatin einer beständigen Umstrukturierung unterworfen ist.

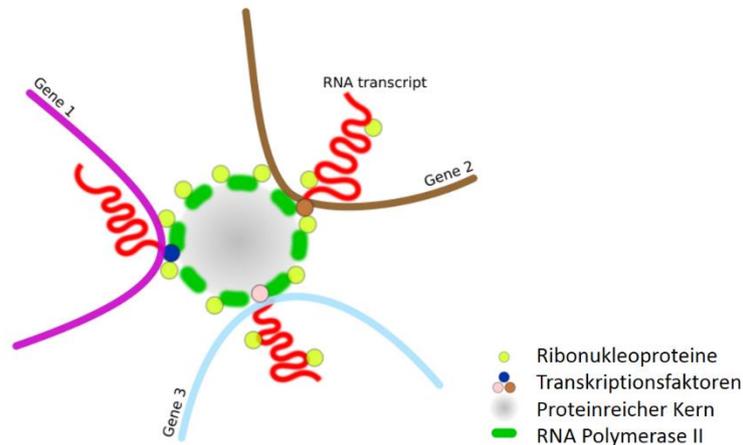


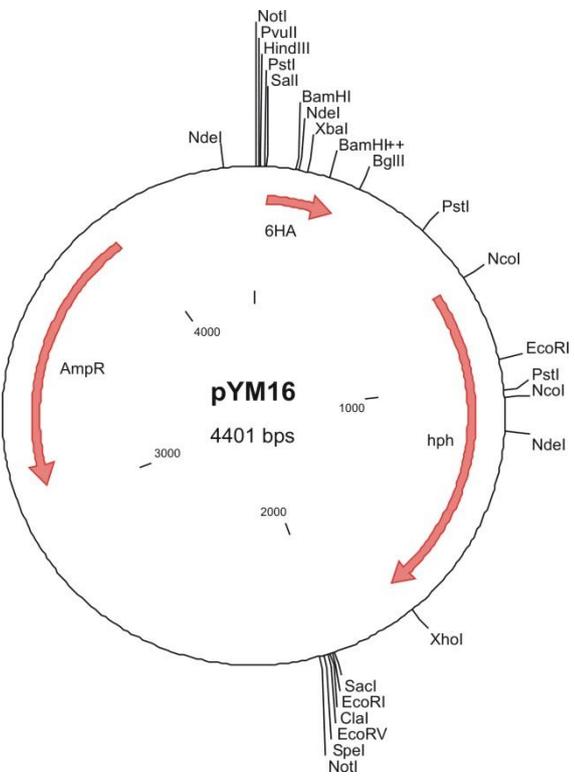
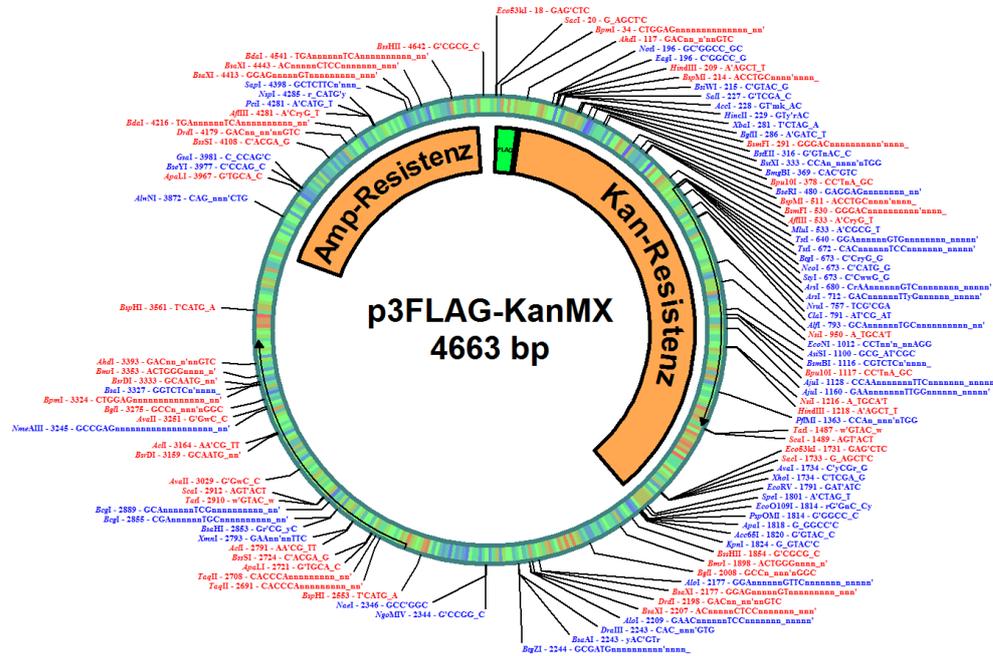
Abbildung 53 Schematischer Aufbau einer Transkriptionsfabrik. Jede Fabrik enthält 2-30 stationäre RNA-Polymerasen, welche auf der Oberfläche des proteinreichen Kerns lokalisiert sind. Dieser hat in HeLa Zellen einen Durchmesser von 87 nm und beinhaltet viele Faktoren der Transkription wie Co-Faktoren, Transkriptionsfaktoren oder Histon-modifizierende Enzyme (Abbildung nach Rieder et al., 2012). Das Chromatin ist in Form von Schleifen (Loops) organisiert, dabei können mehrere Gene an einer Fabrik transkribiert werden.

Der Mediator-Komplex als Transkriptionsplattform könnte durchaus ein weiterer Bestandteil dieser Transkriptionsfabriken sein, zumal er neben seiner Rolle in der Transkriptionsregulation auch eine wichtige Bedeutung in der Organisation der Chromatinarchitektur und der höheren Genomstruktur spielt (Chereji et al., 2017; Hsieh et al., 2015) und auch an der Ausbildung von DNA-Schleifen beteiligt ist (Mukundan and Ansari, 2011; O'Sullivan et al., 2004). In der oben erwähnten Proteomanalyse der verschiedenen Transkriptionsfabriken, wurde der Mediator-Komplex jedoch nicht detektiert, des Weiteren gibt es in *Saccharomyces Cerevisiae* bisher keine Hinweise auf solche Substrukturen im Zellkern. Die bisher diskutierten Eigenschaften des Mediator-Komplexes, die vielen Proteine verschiedener Chromatin Remodeling Komplexe, die als signifikante Interaktionspartner identifiziert wurden und die Tatsache, dass sein Interaktom einem ständigen Umbau unterzogen ist, geben trotzdem Anlass dazu, ihn in Hefe als Bestandteil einer zumindest ähnlichen Substruktur wie die einer Transkriptionsfabriken an zu sehen.

Anhang

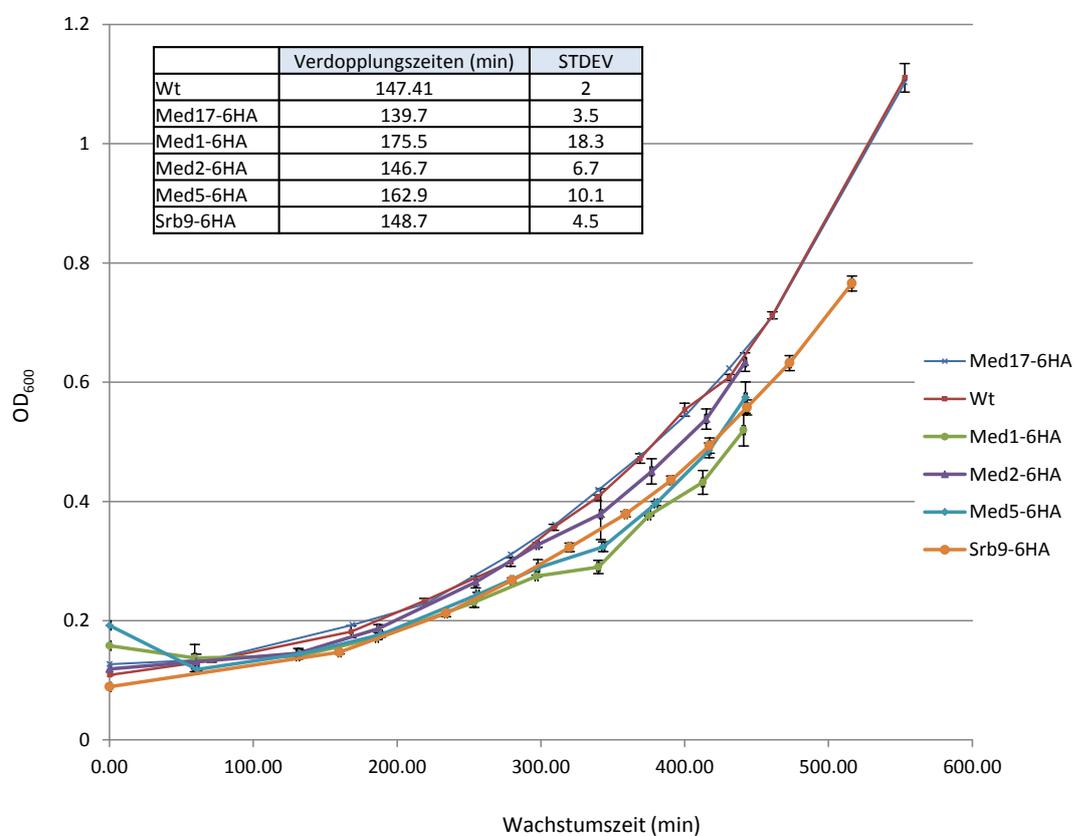
6.1 Vektorkarten verwendete Plasmide

6



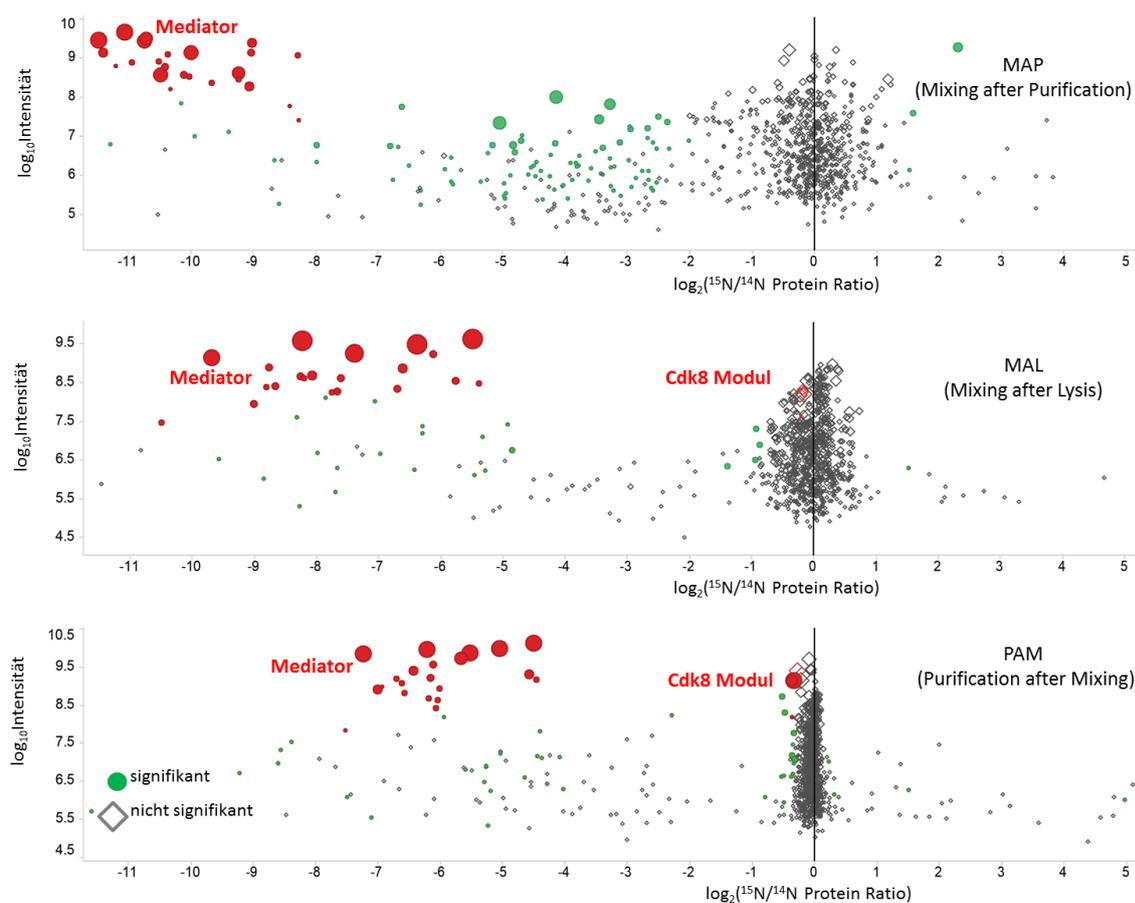
6.2 Methodenvalidierung

6.2.1 Wachstumskurve aller C-Terminal HA-fusionierter Stämme



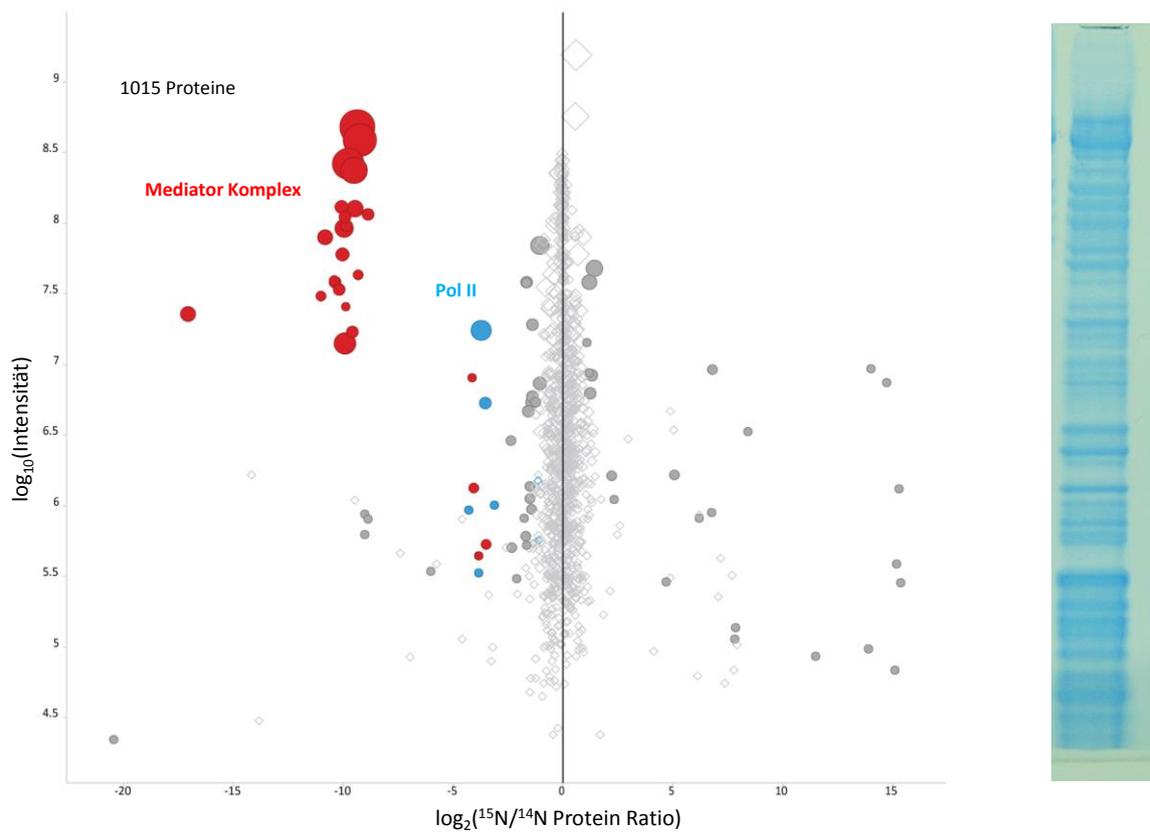
Anhang 1 Grafische Darstellung der Wachstumskurven aller verwendet Stämme. Alle Wachstumskurven wurden in SD-Minimalmedium (1g/l Ammoniumsulfat, 20g/l Glucose) mit 3 unabhängigen Replikaten aufgenommen.

6.2.2 Reproduzierbarkeit des Aufschluss



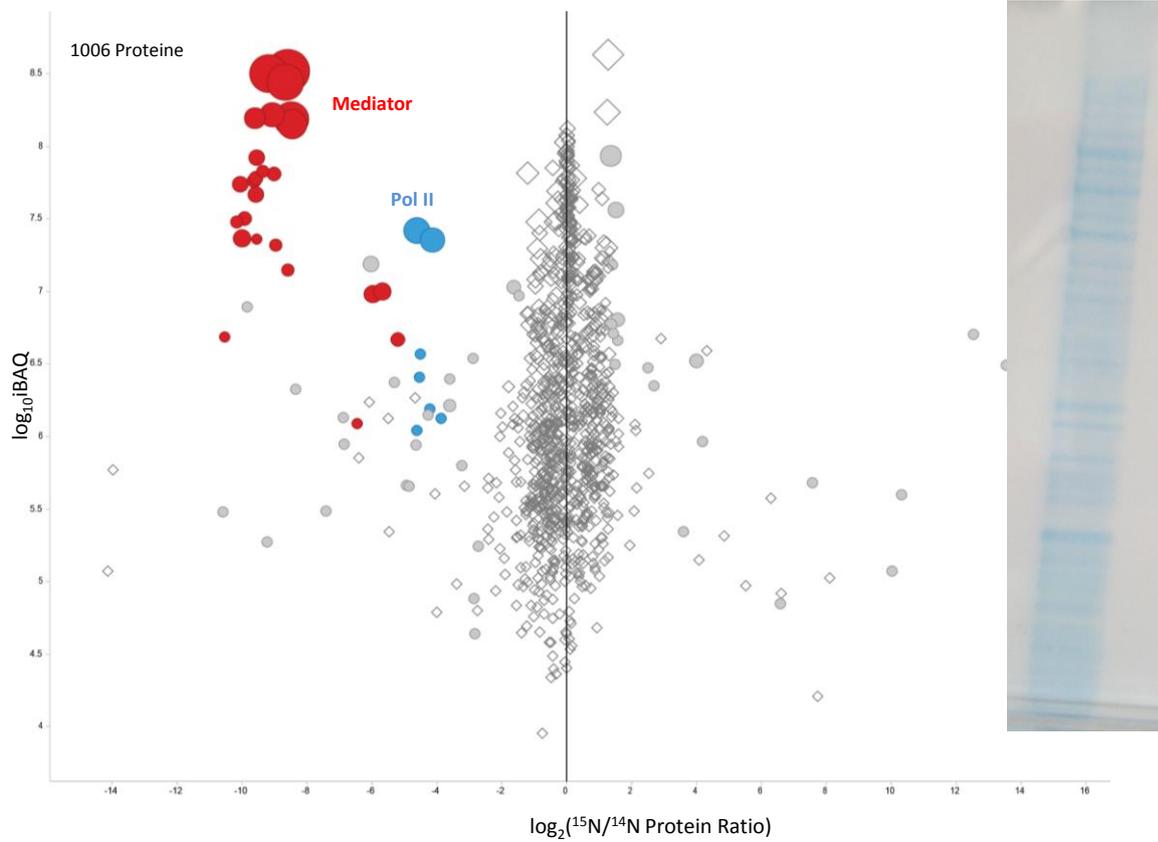
Anhang 2 Grafische Darstellung der Co-Immunopräzipitationen von Med17-HA und dem Kontrollstamm Wt um die Auswirkung der getrennten Versuchsdurchführung auf die Streuung der Messpunkte zu veranschaulichen. Je früher die unterschiedlich markierten Zellen vereint werden und das Kontrollexperiment nicht mehr parallel durchgeführt wird, umso geringer ist die Streuung der unspezifisch bindenden Proteine. MAP: Die Zellen (Wt und Med17-HA) wurden getrennt voneinander geerntet, aufgeschlossen auch die IP's erfolgte getrennt. MAL: Die Zellen wurden getrennt voneinander geerntet und aufgeschlossen. Die Lysate wurden vermischt und eine IP durchgeführt. PAM: Die Zellen wurden zusammen geerntet und aufgeschlossen. Es wurde nur eine IP durchgeführt.

6.2.3 Zellaufschluss mit Glaskügelchen



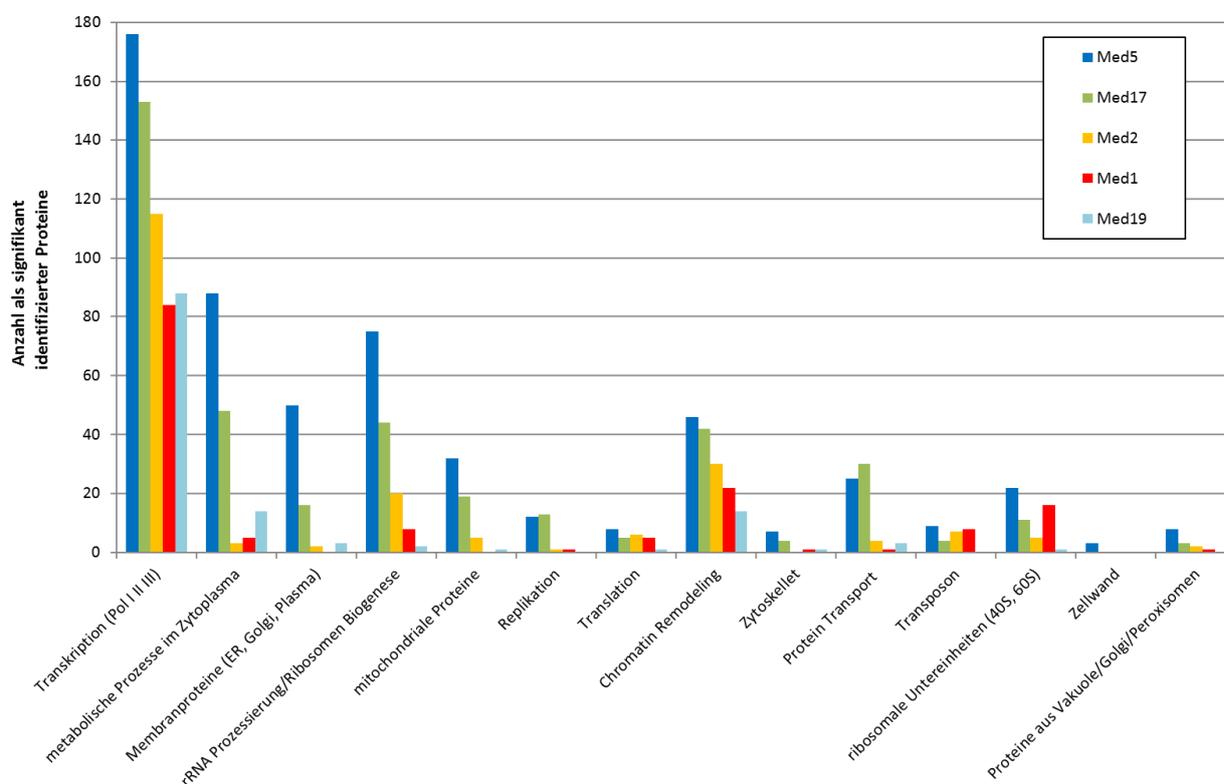
Anhang 3 Co-Immunpräzipitation des Mediator Komplexes über die HA-fusionierte Untereinheit Med17 und dem Kontrollstamm (Wt). Die Zellen wurden in 5ml Lysepuffer pro Gramm Zellpellet aufgeschlämmt, mit einem Volumenanteil Glaskügelchen versetzt und 6x 1 Minute bei 30 Hertz geschüttelt. Zwischen jedem Zyklus wurde das Gemisch 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Die weitere Probenaufbereitung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Das angefärbte Gel nach der SDS-PAGE der Elution ist rechts abgebildet. Die MS/MS Analyse des gesamten Gels führte zu Quantifizierung von 1050 Proteinen.

6.2.4 Co-Immunopräzipitation mit HA-Peptid Elution



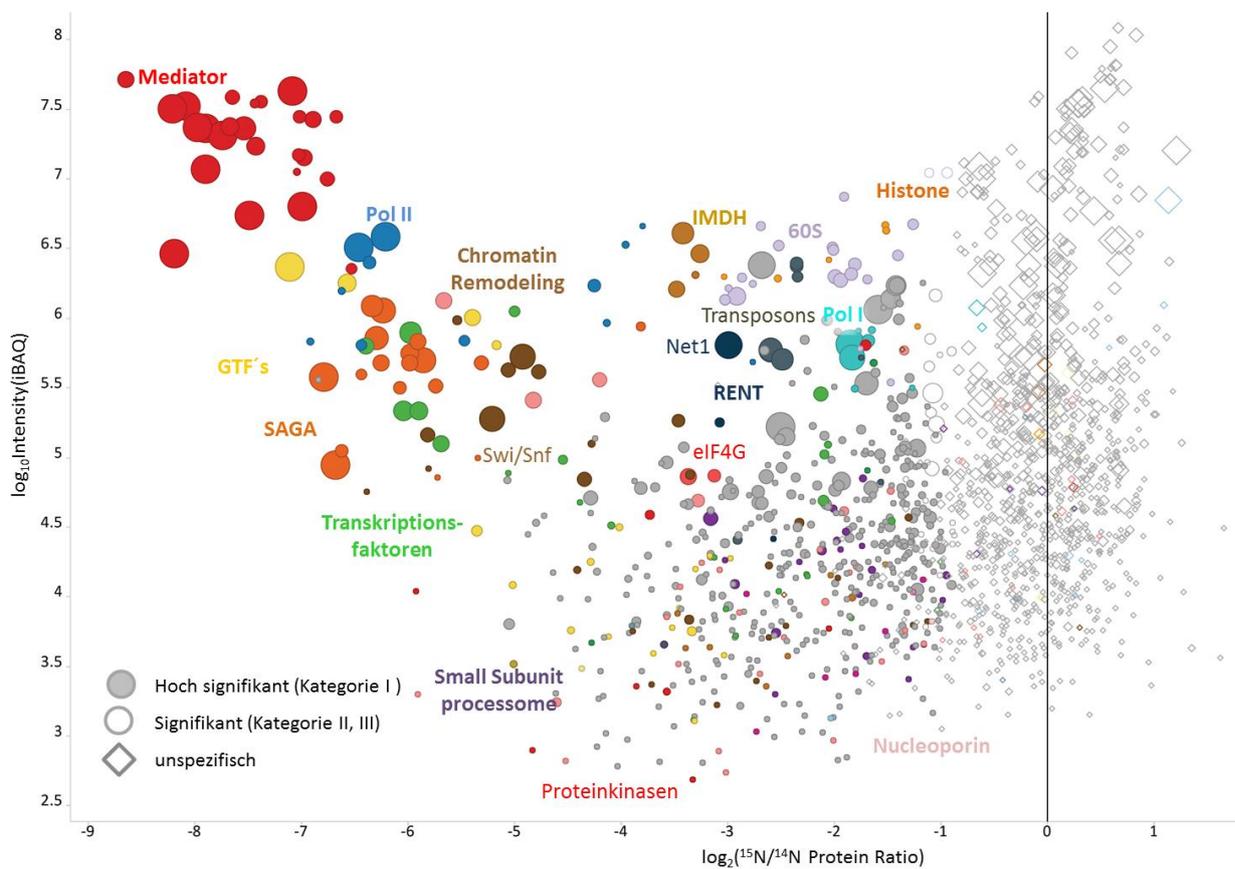
Anhang 4 Co-Immunopräzipitation des Mediator Komplexes über die HA-fusionierte Untereinheit Med17 und dem Kontrollstamm (Wt). Die Elution der an die Antikörper gebundenen Proteine erfolgte über kompetitive Elution mit HA-Peptid (2mg/ml im Lysepuffer). Dafür wurden die magnetischen Beads 2x 15 min in 200µl Peptidlösung bei Raumtemperatur inkubiert, die Eluate miteinander vereint und mit Aceton präzipitiert. Das angefärbte Gel nach der SDS-PAGE der Elution ist rechts abgebildet.

6.3 Co-Immunopräzitationen anderer Mediatoruntereinheiten

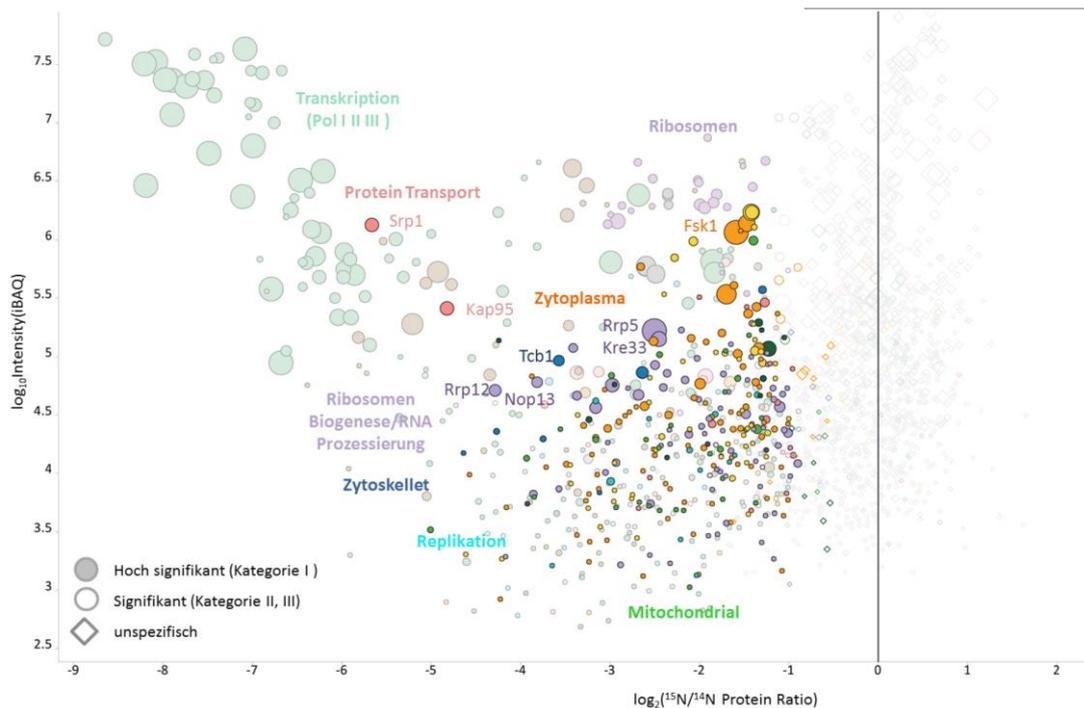


Anhang 5 Grafische Darstellung der Verteilung der als signifikant identifizierten Proteine aus allen Immunopräzitationen mit Untereinheiten des Mediator-Kernkomplexes für ausgewählte Funktionen. Die zugeordnete Funktionalität entspricht den GO-Annotationen (<http://www.geneontology.org>). Der Funktionalität „Transkription (Pol I II II)“ sind alle Proteine zugeordnet die an der Transkriptionsinitiation, ~elongation, ~termination aller RNA-Polymerasen beteiligt sind.

6.3.1 Co-Immunopräzipitation Med5-HA (Triplikation)

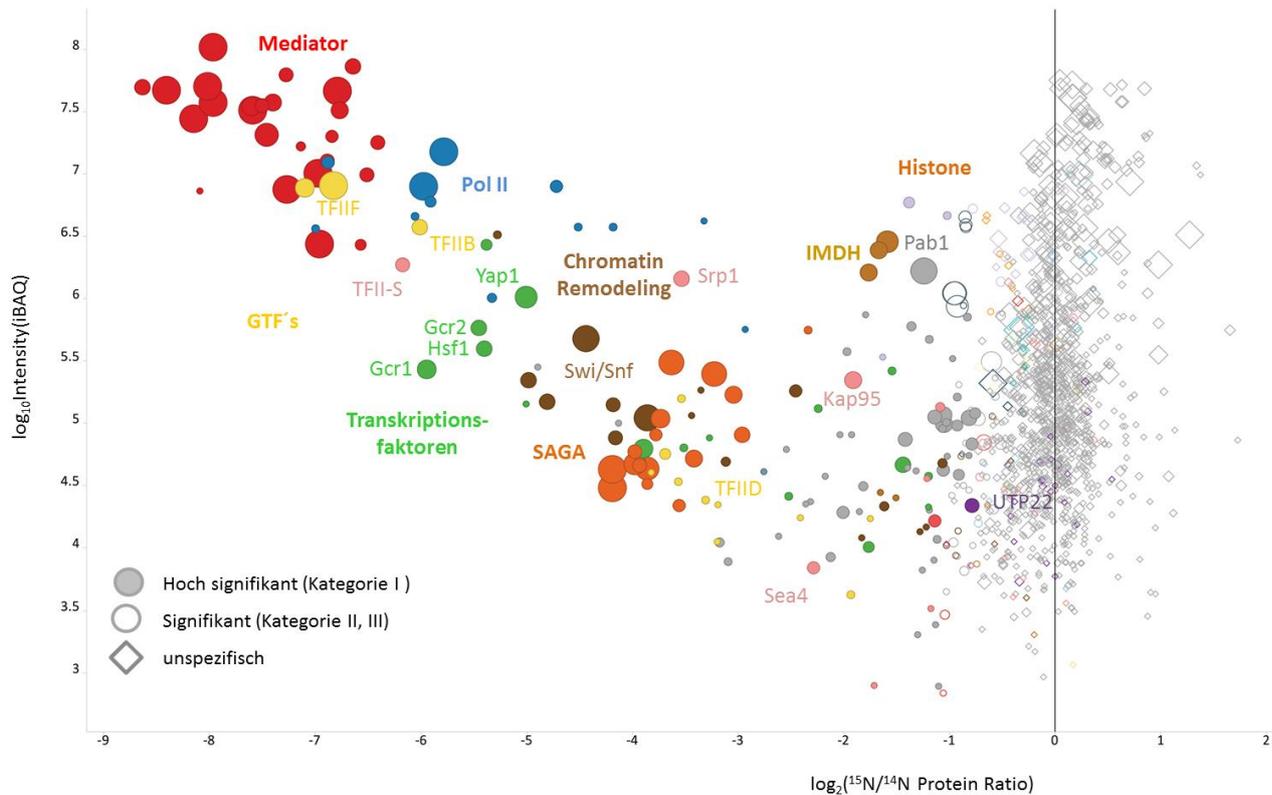


Anhang 6 Interaktom des Mediator-Komplexes, co-isoliert durch die 3xHA-getaggte Untereinheit Med5. Farblich markiert sind alle Proteine, die Proteinkomplexen oder bestimmten Funktionsklassen zugeordnet werden können



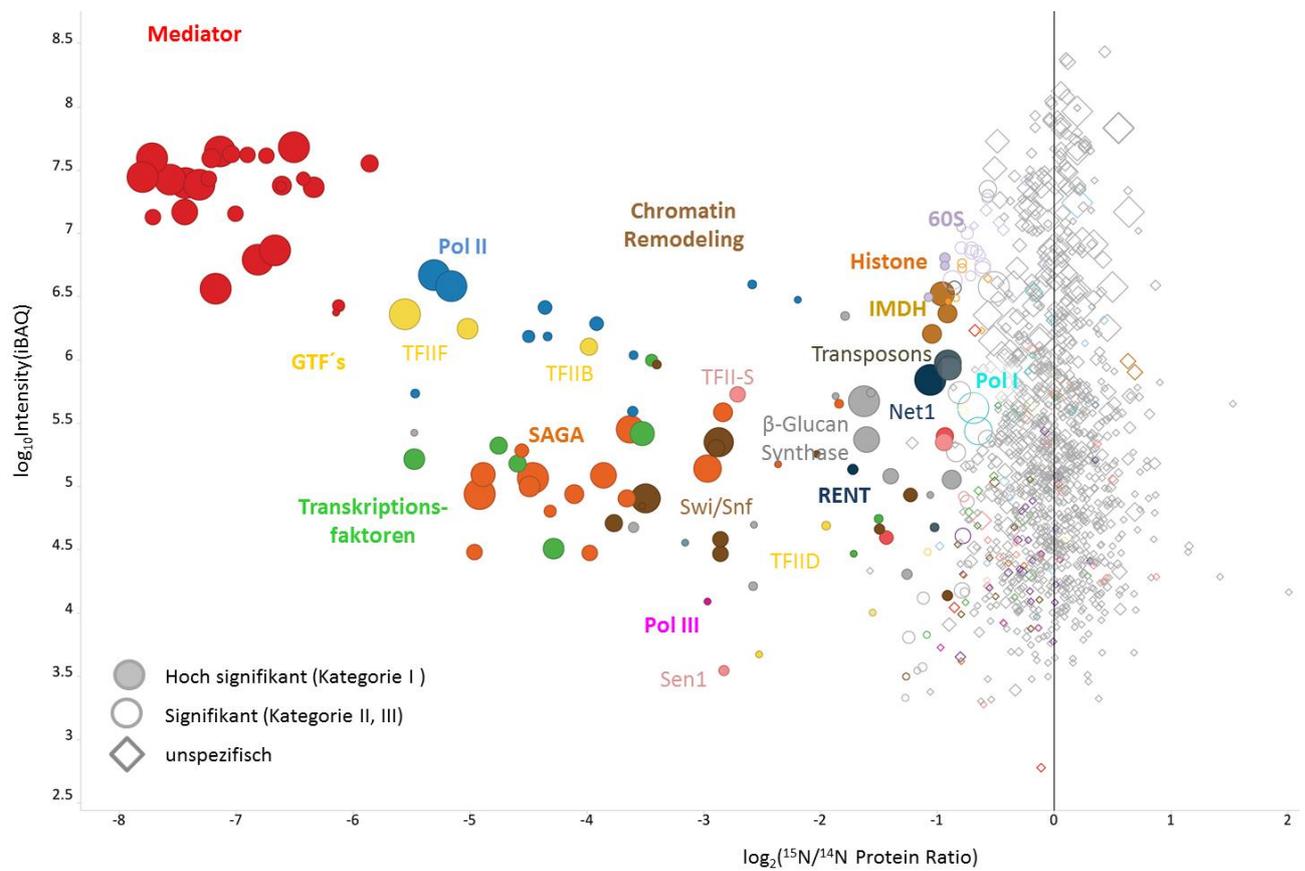
Anhang 7 Interaktom des Mediator Komplex, co-isoliert durch die 3xHA-getaggte Untereinheit Med5. Farblich einheitlich markiert sind alle Proteine die der gleichen GO-Annotationen zugeordnet werden können.

6.3.2 Co-Immunopräzipitation Med2-HA (Triplikate)



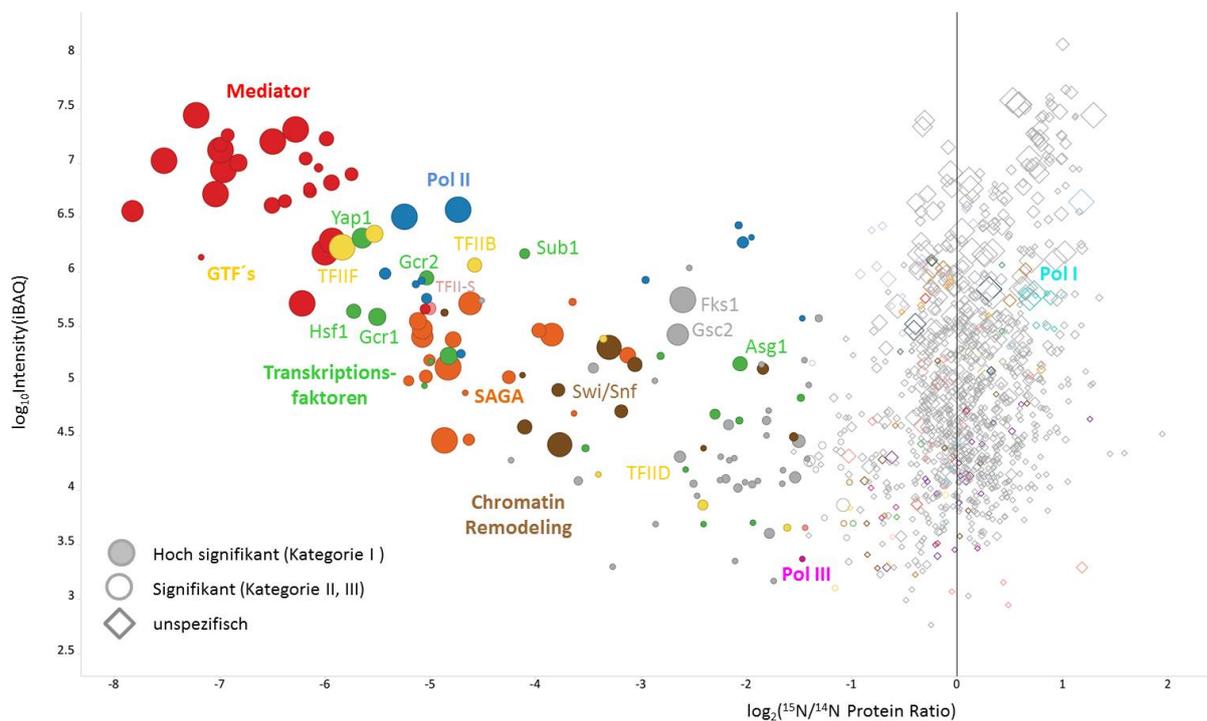
Anhang 8 Interaktom des Mediator Komplex, co-isoliert durch die 3xHA-getaggte Untereinheit Med2 (Schwanzmodul). Farblich markiert sind alle Proteine die Proteinkomplexen oder bestimmten Funktionsklassen zugeordnet werden können.

6.3.3 Co-Immunopräzipitation Med1-HA (Triplikat)



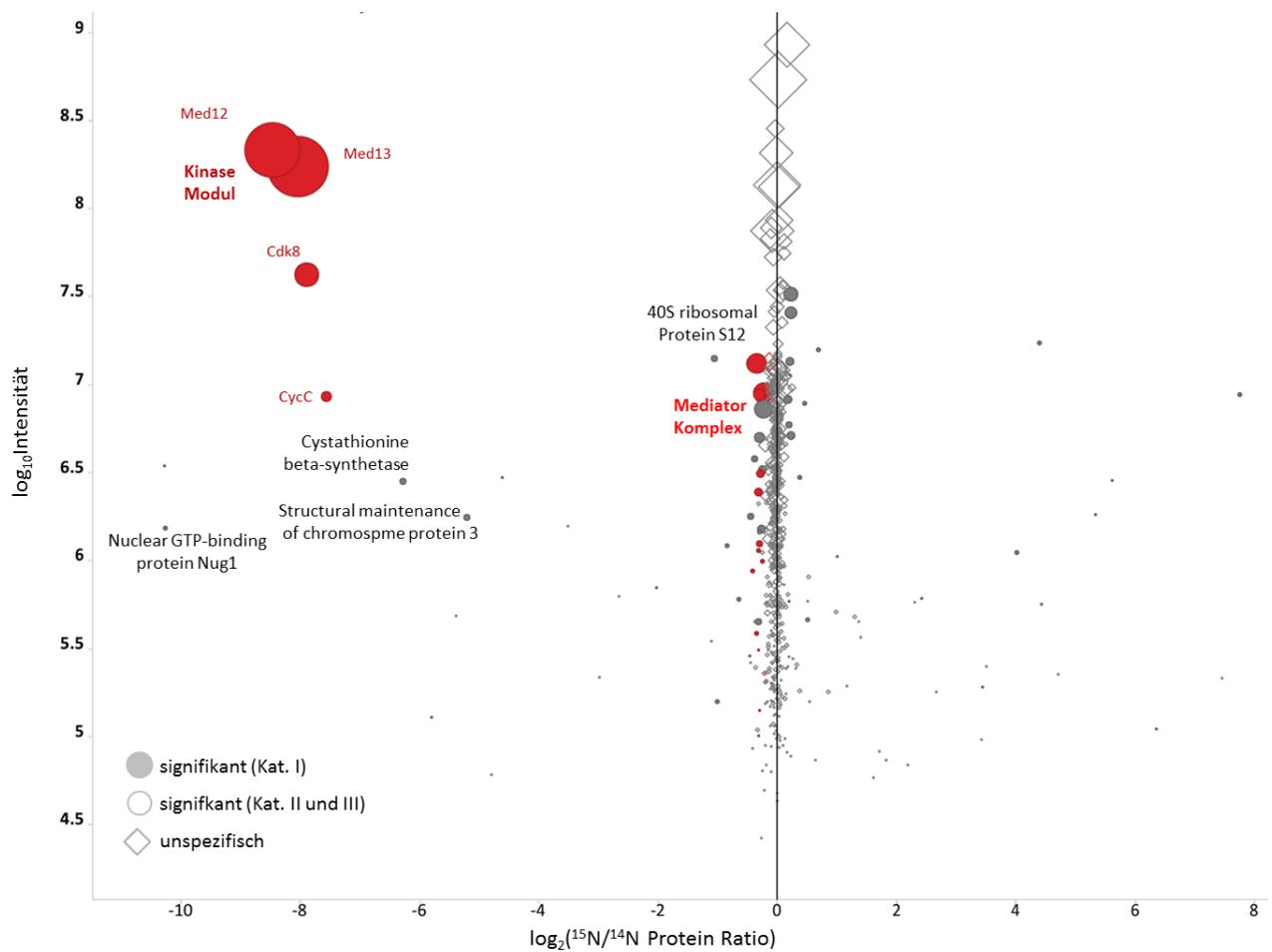
Anhang 9 Interaktom des Mediatorkomplex, co-isoliert durch die 3xHA-getaggte Untereinheit Med1 (Mittelmodul). Farblich markiert sind alle Proteine die Proteinkomplexen oder bestimmten Funktionsklassen zugeordnet werden können.

6.3.4 Co-Immunopräzipitation Med19-HA (Triplikation)



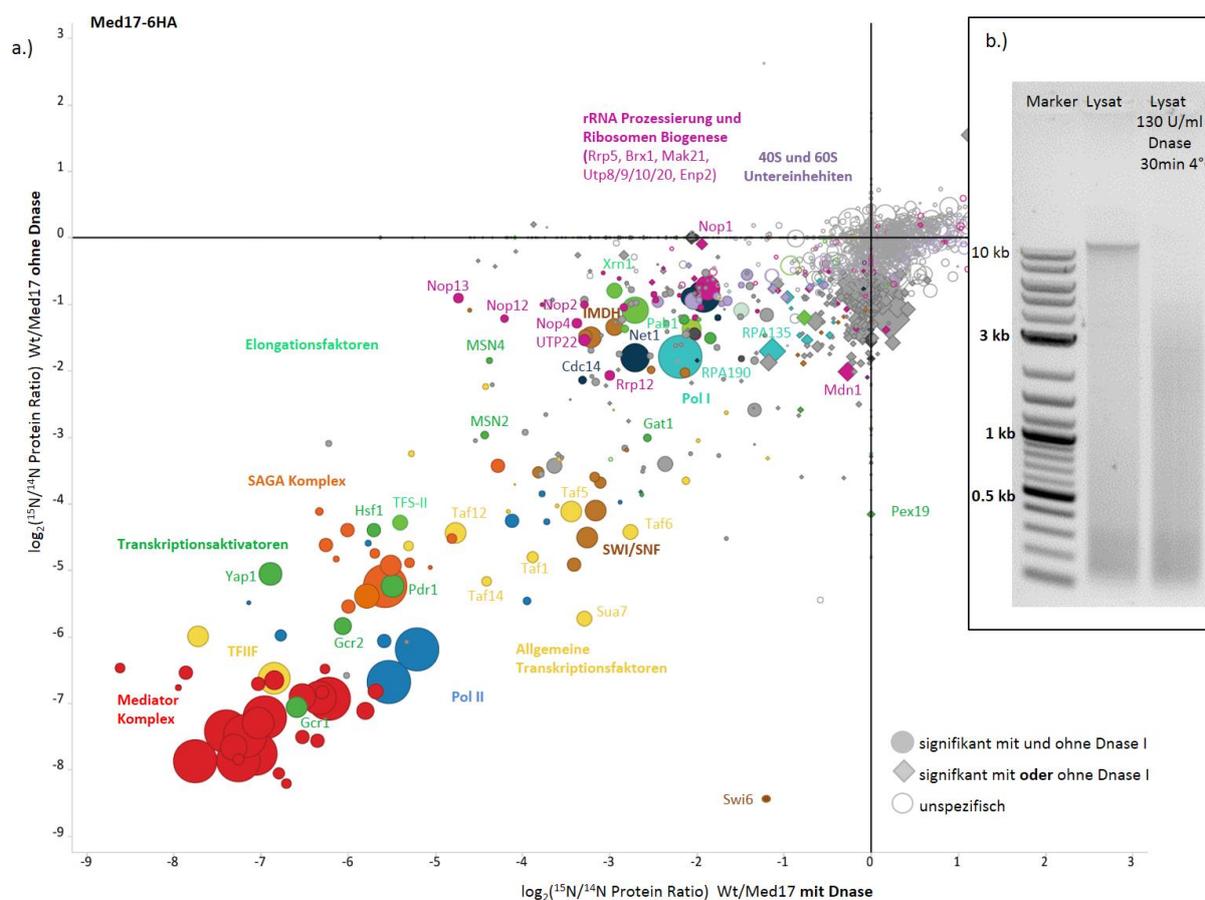
Anhang 10 Interaktom des Mediator-Komplexes, co-isoliert durch die 3xHA-getaggte Untereinheit Med19 (Mittelmodul). Farblich markiert sind alle Proteine, die Proteinkomplexen oder bestimmten Funktionsklassen zugeordnet werden können.

6.3.5 Co-Immunopräzipitation Srb9-FLAG (PAM Einzelexperiment)



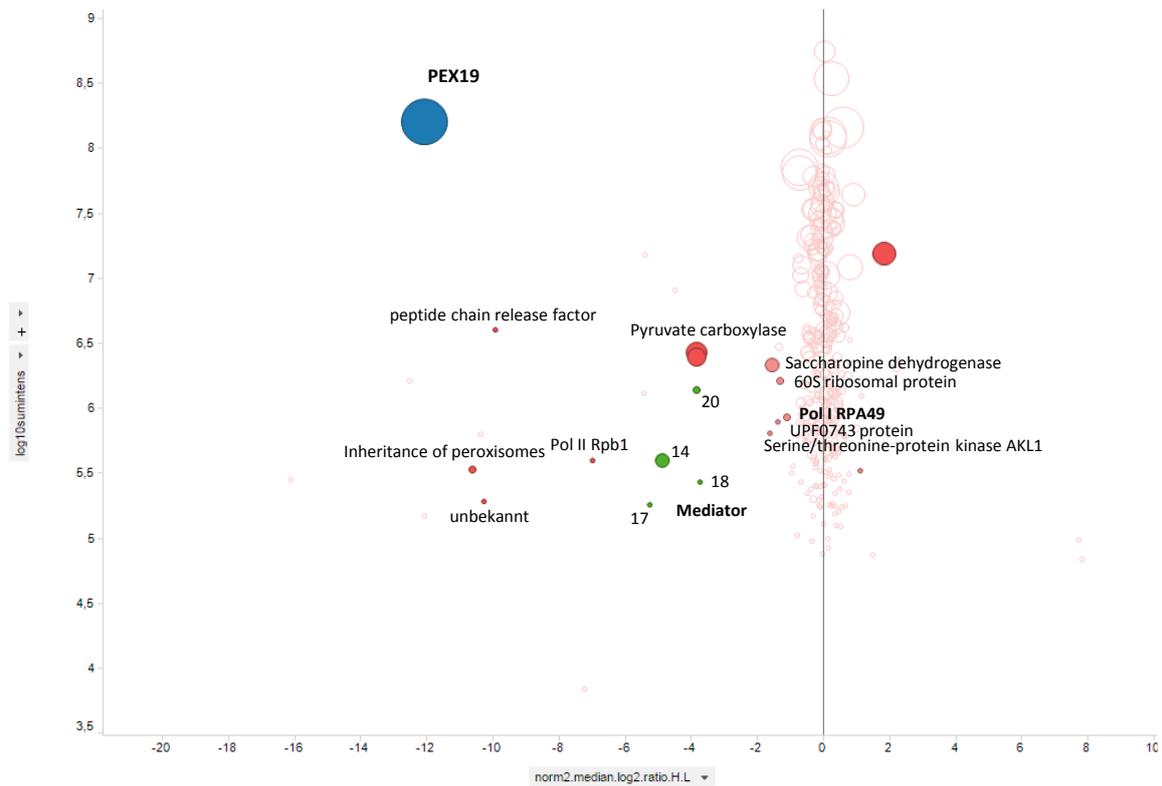
Anhang 11 Purification after Mixing (PAM) Experiment mit dem 3fach FLAG getaggten Kinasemodul (Srb9/Med13-3xFLAG)^(14N) und dem Kontrollstamm (^{15N}). Die Zellen wurden vor der Ernte 1:1 vermischt und zusammen geerntet und mittels Kryogrinding aufgeschlossen. Die Immunopräzipitation erfolgte mittels an Agarose gekoppelte Antikörper gegen das FLAG-Epitop für 2h bei 4°C. Die gebundenen Proteine wurden nach dem Waschen durch das Aufkochen der Agarosebeads in 1xLDS Probenpuffer von den Antikörpern gelöst. Die auf der Y-Achse aufgetragenen Intensitätswerte sind nicht auf den iBAQ normalisiert.

6.3.6 Co-Immunopräzipitation Med17-HA mit DNase I Behandlung (Einzelexperiment)



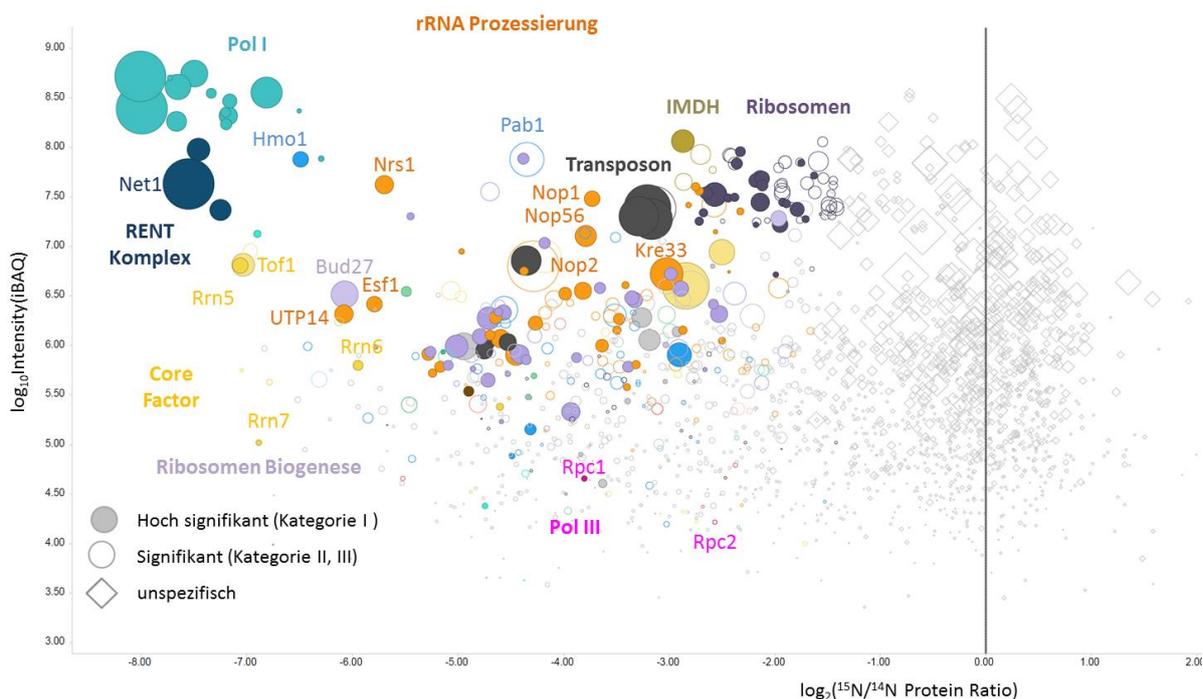
Anhang 12 a.) Gegenüberstellung der Interaktomanalyse der 6fach Hisolierete DNA aus zentrifugiertem Zelllysat (Zymoresearch – Quick DNA Kit[®]) nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C mit und ohne DNase I. **Co-Immunopräzipitationen anderer Proteine**

6.4.1 Co-Immunopräzipitation Pex19-HA (Einzelexperiment)



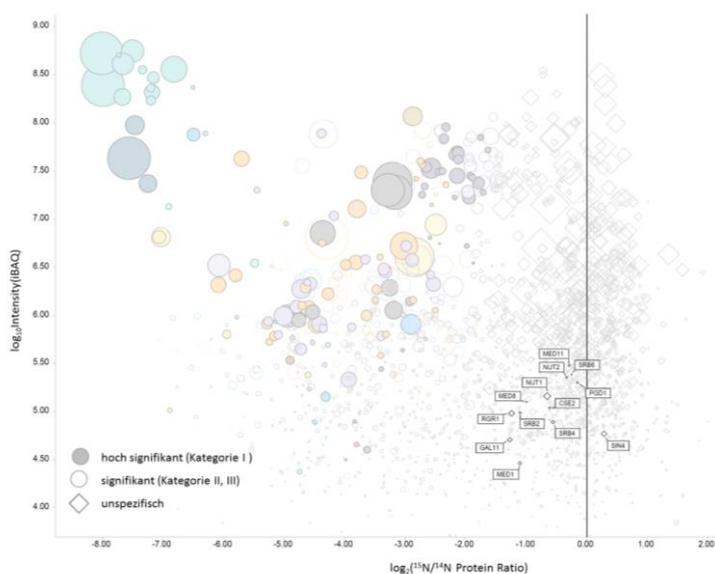
Anhang 13 Interaktom des peroxisomalen Membranproteins Pex19. Aufgetragen sind die Proteinverhältnisse zur parallel durchgeführten ^{15}N -markierten Kontroll-IP. Die als signifikant identifizierten Untereinheiten des Mediatorkomplexes sind in grün dargestellt (Abbildung von Larissa Höll).

6.4.2 Co-Immunopräzipitation Rpa190 (Triplikation)

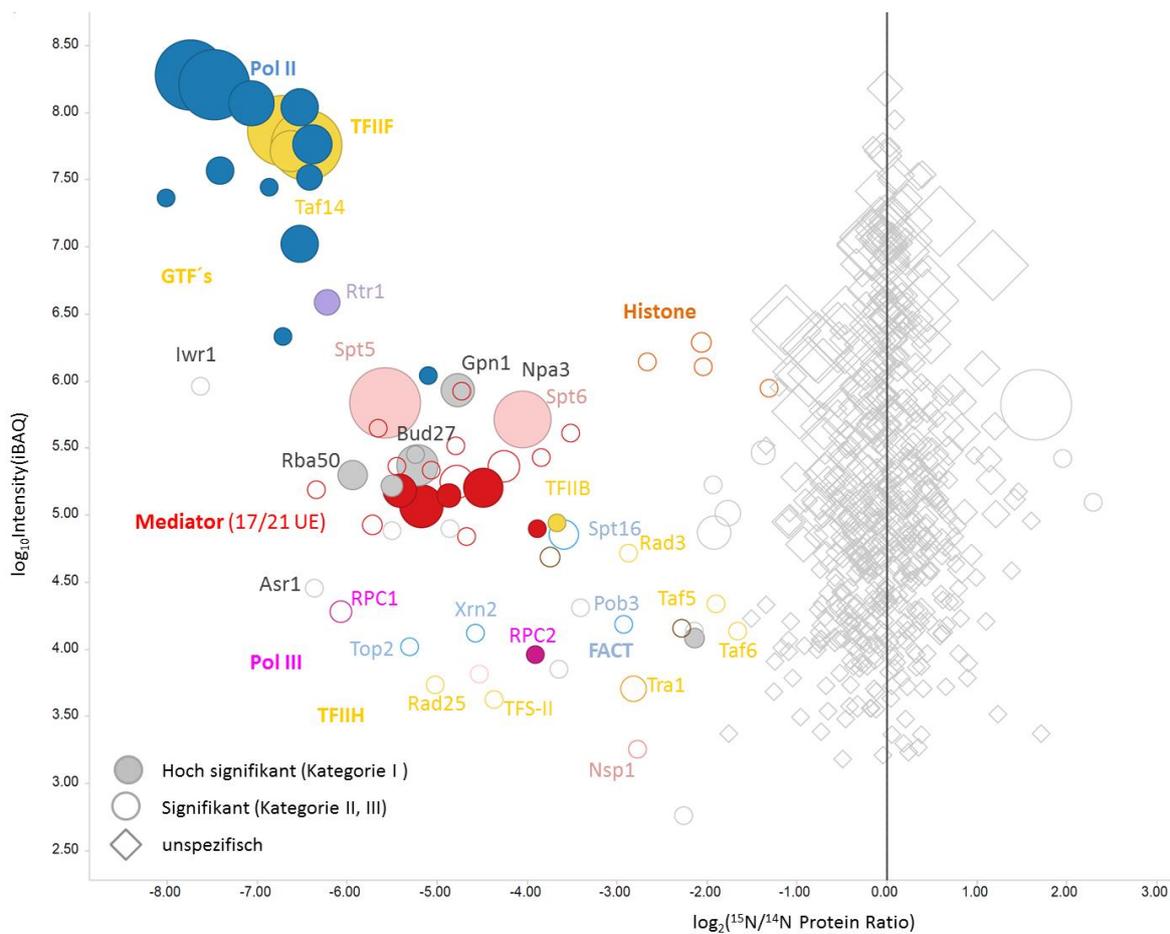


Anhang 14 Oben: Interaktom der 6fach HA-getaggten Polymerase I Untereinheit Rpa190 (Triplikation). Farblich markiert sind alle Proteine die sich bestimmten Komplexen (z.B RENT Komplex = dunkelblau) oder funktionalen Kategorien (z.B Ribosomen Biogenese = lila) zuordnen lassen.

Links: Interaktom der 6fach HA-getaggten Polymerase I Untereinheit Rpa190 (Triplikation). Markiert sind alle identifizierten Untereinheiten des Mediator Komplexes

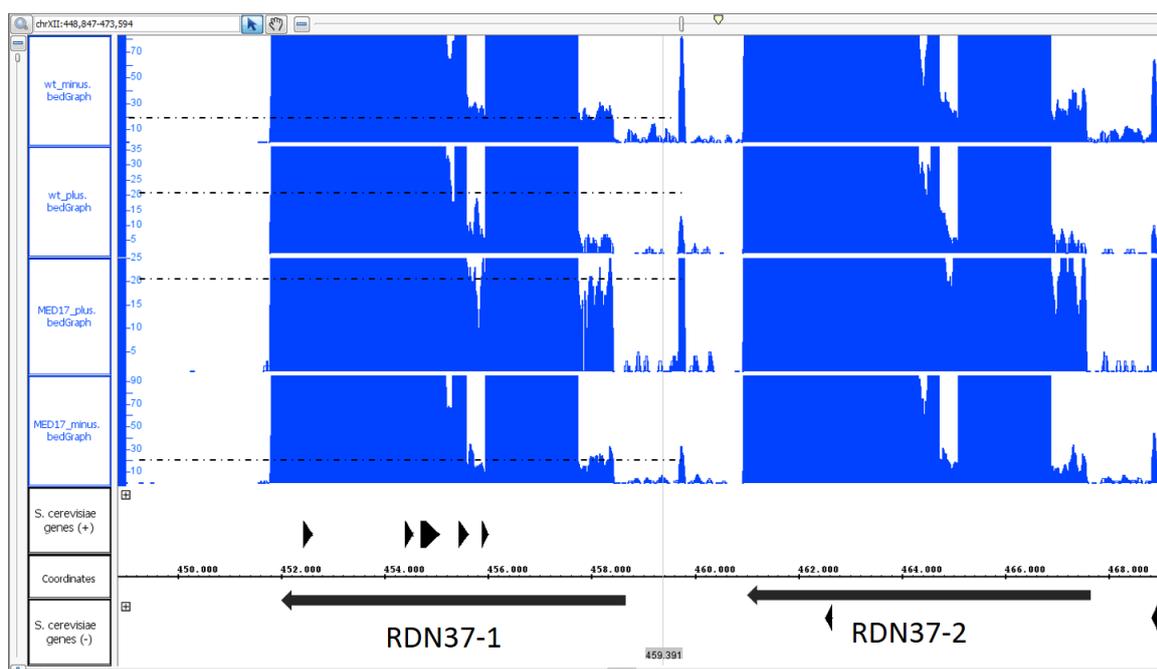


6.4.3 Co-Immunopräzipitation Rpb3-HA (Triplikation)



Anhang 15 Interaktom der 6fach HA getaggten Polymerase II Untereinheit Rpb3 (Triplikation). Farblich markiert sind alle Proteine die einem Proteinkomplex oder einer funktionalen Klasse zugeordnet werden können (Daten: Larissa Höll)

6.5 RNA-Sequenzierung



Anhang 16 Ausschnitt aus der Datendarstellung der RNA-Sequenzierung durch das Programm Integrated Genome Browser. Dargestellt sind die Datensätze der Sequenzierung der RNA gewonnen aus der Co-IP mit der getaggten Mediatoruntereinheit Med17 und dem Kontrollexperiment (Wt), beides mit und ohne DnaseI Behandlung. Im dargestellten Ausschnitt sind nur die Sequenzen dargestellt die dem Bereich auf Chromosome XII zugeordnet werden konnten, der für die Vorläufer rRNA codiert (37S-RNA).

6.6 Posttranslationale Modifikationen

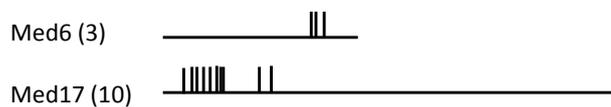
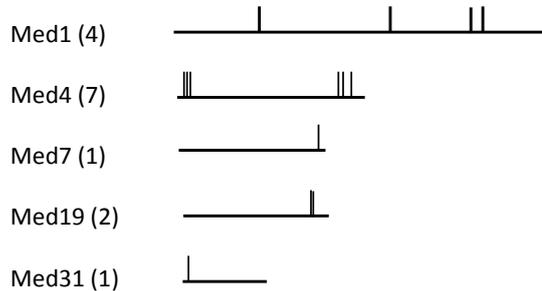
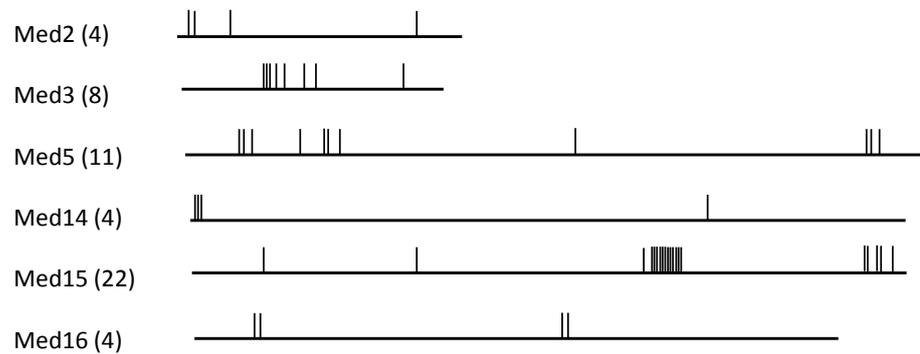
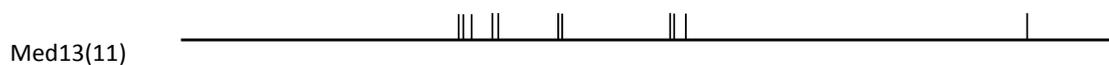
Anhang 17 Tabellarische Auflistung aller detektierten Phosphorylierungen, deren Position im Protein und die Kennzeichnung ob sie in früheren Publikationen veröffentlicht wurden (X-JA)

Mediator subunit	Nr. der Aminosäure	Relative Position	publiziert	Gesamtanzahl
Med 1	155	S	X	4
	364	S	X	
	404	S	X	
	423	S	X	
Med 2	6	S	X	4
	10	S	X	
	68	S		
	383	T		
Med 3	149	T		8
	151	T		
	155	T		
	168	S		
	195	T	X	
	245	T		

	265	S		
	310	S		
Med 4	18	S	X	7
	19	S	X	
	20	S	X	
	222	S	X	
	237	T	X	
	240	T	X	
	242	S	X	
Med 5	64	T	X	11
	66	S	X	
	75	T		
	196	S		
	251	T		
	257	S	X	
	268	S	X	
	682	S	X	
	1014	S	X	
	1043	T		
1047	Y			
Med 6	225	S	X	3
	228	S	X	
	256	T	X	
Med 7	216	S		1
Med 8,9,10,11	Keine Modifizierung			
Med 13	370	S		11
	375	S		
	387	S		
	425	S	X	
	450	S		
	453	T		
	521	S		
	601	T		
	636	S		
	748	S		
	1251	S		
Med14	3	T	X	4
	4	T	X	
	7	S	X	
	871	S		

Med 15	163	T	X	22
	307	S		
	729	S	X	
	730	S	X	
	750	T	X	
	767	S	X	
	769	T		
	783	S	X	
	785	S	X	
	789	S	X	
	793	T	X	
	796	S	X	
	798	S	X	
	800	T	X	
	803	S	X	
	804	T	X	
	810	S	X	
	816	T		
	820	T	X	
	831	S	X	
	984	S	X	
	985	S	X	
1003	S	X		
1018	S	X		
1034	S	X		
Med 16	85	S		4
	87	T		
	431	S		
	515	S		
Med 17	32	S		10
	36	S		
	37	S		
	40	S		
	42	T		
	50	S		
	56	T	X	
	57	S	X	
	141	S		
	187	T		
Med 18	Keine Modifizierung			
Med 19	204	T	X	2

	210	S	X	
Med 20,21,22	PTM not detected			
Med 31	11	T	X	1

Kopfmodule**Mittelmodule****Schwanzmodule****Kinase module**

Anhang 18 Schematische Darstellung der detektierten Phosphorylierungen bezüglich ihrer relativen Verteilung innerhalb des Proteins

6.7 Tabellen

6.7.1 Interaktionspartner aller Untereinheiten des Kernmodul

Anhang 19 Auflistung aller als signifikant ermittelten Proteine die über die HA-getaggten Untereinheiten Med5, Med1, Med17, Med2 und Med19 co-isoliert werden konnten. Alle Werte entsprechen den Triplikaten des jeweiligen Experimentes. Die Signifikanz wird für Proteine der Kategorie I mit dem Wert 2 und für die Kategorien II und III mit dem Wert 1 angegeben. Die farbliche Kodierung entspricht den $\log_2(H/L)$ -Werten unter 0 rot und über 0 blau. Bei leeren Feldern konnte mit der jeweiligen Untereinheit das Protein nicht identifiziert werden.

Komplex (C)/ Funktion (F) / Organell (O)	Gen	Med5-6HA (3x)			Med1-6HA (3x)			Med17-6HA (3x)			Med2-6HA (3x)			Med19-6HA (3x)		
		\log_{10} iBAQ	\log_2 (H/L)	Signifikanz												
Mediator (C)	MED8	7.72	-8.65	2	7.63	-7.05	2	8.03	-7.82	2	7.69	-8.64	2	7.17	-6.99	2
Mediator (C)	MED5	7.31	-7.74	2	7.45	-7.80	2	8.04	-7.68	2	7.67	-8.41	2	7.02	-7.53	2
Mediator (C)	MED22	7.54	-7.44	2	7.37	-6.62	2	7.93	-7.68	2	7.22	-7.13	2	6.95	-6.06	2
Mediator (C)	MED3	7.59	-7.65	2	7.62	-6.91	2	7.99	-7.61	2	7.80	-7.27	2	7.26	-6.92	2
Mediator (C)	MED16	7.07	-7.90	2	7.43	-7.57	2	8.07	-7.54	2	7.58	-7.97	2	6.72	-7.04	2
Mediator (C)	MED19	7.00	-6.76	2	7.13	-7.72	2	8.00	-7.45	2	7.55	-7.51	2	6.65	-6.38	2
Mediator (C)	MED6	7.37	-7.54	2	7.17	-7.45	2	7.95	-7.40	2	7.31	-7.46	2	6.56	-7.83	2
Mediator (C)	SRB8	6.46	-8.20	2	6.57	-7.18	2	7.02	-7.40	2	6.44	-6.96	2	5.71	-6.22	2
Mediator (C)	MED14	7.37	-7.90	2	7.40	-7.44	2	7.78	-7.34	2	7.45	-8.15	2	6.94	-6.96	2
Mediator (C)	MED15	7.52	-8.08	2	7.65	-7.14	2	8.01	-7.31	2	8.02	-7.97	2	7.44	-7.22	2
Mediator (C)	MED1	7.37	-7.98	2	7.38	-7.32	2	7.87	-7.28	2	7.51	-7.59	2	7.12	-6.99	2
Mediator (C)	MED17	7.50	-8.21	2	7.59	-7.72	2	8.10	-7.23	2	7.70	-8.02	2	7.20	-6.50	2
Mediator (C)	SSN2	6.80	-6.99	2	6.79	-6.82	2	7.40	-7.02	2	6.87	-7.27	2	6.19	-6.00	2
Mediator (C)	MED18	7.24	-7.43	2	7.59	-7.22	2	8.03	-6.88	2	7.57	-7.40	2	6.62	-6.50	2
Mediator (C)	MED31	7.05	-7.05	2	6.38	-6.15	2	7.26	-6.81	2	6.87	-8.09	2	6.14	-7.17	2
Mediator (C)	MED10	7.17	-7.03	2	7.16	-7.01	2	7.81	-6.76	2	6.99	-6.51	2	6.74	-6.15	2
Mediator (C)	MED4	7.63	-7.09	2	7.68	-6.51	2	8.14	-6.74	2	7.67	-6.79	2	7.31	-6.27	2
Mediator (C)	SSN3	6.74	-7.49	2	6.87	-6.67	2	7.36	-6.66	2	7.01	-6.97	2	6.28	-5.93	2
Mediator (C)	MED20	7.43	-6.89	2	7.55	-5.86	2	8.01	-6.58	2	7.87	-6.64	2	7.22	-5.98	2
Mediator (C)	MED7	7.15	-6.98	2	7.38	-6.62	2	7.83	-6.55	2	7.51	-6.77	2	6.82	-5.94	2
Modifikation	SMT3	5.56	-6.84	2	5.43	-5.48	2	5.37	-6.48	2	5.45	-4.89	2	5.74	-4.51	2
Mediator (C)	MED2	7.38	-7.67	2	7.37	-6.34	2	7.60	-6.47	2	7.54	-7.60	2	7.00	-6.82	2
Polymerase II (C)	RPB1	6.51	-6.46	2	6.58	-5.16	2	7.46	-6.46	2	6.90	-5.98	2	6.51	-5.24	2
Transkriptionsaktivatoren (F)	GCR1	5.33	-6.04	2	5.22	-5.48	2	6.01	-6.44	2	5.44	-5.94	2	5.59	-5.51	2
Mediator (C)	MED9	7.55	-7.38	2	7.62	-6.75	2	7.89	-6.43	2	7.25	-6.41	2	6.90	-5.75	2
TFIIF (C)	T2FA	6.37	-7.11	2	6.36	-5.56	2	7.31	-6.41	2	6.91	-6.83	2	6.23	-5.84	2
Mediator (C)	MED11	7.45	-7.02	2	7.43	-7.24	2	7.93	-6.37	2	7.10	-6.89	2	7.05	-6.18	2
Mediator (C)	MED21	7.44	-6.67	2	7.43	-6.42	2	8.20	-6.31	2	7.30	-6.84	2	6.77	-6.15	2
Polymerase II (C)	RPB2	6.58	-6.21	2	6.67	-5.31	2	7.37	-6.28	2	7.18	-5.78	2	6.57	-4.73	2
Mediator (C)	SSN8	6.36	-6.53	2	6.43	-6.13	2	6.91	-6.26	2	6.43	-6.57	2	5.66	-5.05	2

Polymerase II (C)	RPB3	5.81	-6.44	2	6.19	-4.50	2	7.26	-6.11	2	6.78	-5.91	2	5.76	-5.03	2
TFIIB	TF2B	6.00	-5.40	2	6.10	-3.98	2	7.07	-5.91	2	6.58	-6.01	2	6.06	-4.58	2
Polymerase II (C)	RPB4	6.40	-6.36	2	6.42	-4.36	2	7.22	-5.85	2	7.10	-6.88	2	5.99	-5.43	2
SAGA (C)	SPT7	5.58	-6.80	2	5.07	-4.46	2	5.58	-5.81	2	4.63	-4.19	2	5.13	-4.83	2
Polymerase II (C)	RPB9	6.20	-6.62	2	6.18	-4.33	2	7.28	-5.68	2	6.66	-6.06	2	5.92	-5.08	2
TFIIF (C)	T2FB	6.26	-6.57	2	6.25	-5.02	2	7.00	-5.68	2	6.89	-7.10	2	6.35	-5.53	2
SAGA (C)	SPT20	6.09	-6.33	2	5.10	-4.89	2	5.49	-5.67	2	4.68	-3.98	2	5.48	-5.07	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	PDR1	5.33	-5.90	2	4.51	-4.29	2	5.24	-5.64	2	4.80	-3.89	2	5.23	-4.82	2
SWI/SNF	TAF14	5.98	-5.54	2	5.96	-3.40	2	6.95	-5.52	2	6.52	-5.28	2	5.63	-4.87	2
SAGA (C)	TRA1	4.95	-6.69	2	4.94	-4.92	2	5.36	-5.48	2	4.48	-4.19	2	4.46	-4.87	2
Polymerase II (C)	RPB11	5.84	-5.47	2	5.60	-3.61	2	7.06	-5.47	2	6.01	-5.33	2	5.25	-4.71	2
SAGA (C)	HFI1	5.51	-5.74	2	4.49	-4.96	2	5.44	-5.43	2	4.66	-3.93	2	5.04	-5.04	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	YAP1	5.89	-5.98	2	5.42	-3.53	2	6.23	-5.40	2	6.01	-5.00	2	6.31	-5.64	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	GCR2	5.80	-6.40	2	5.33	-4.76	2	6.37	-5.34	2	5.76	-5.46	2	5.95	-5.03	2
SAGA (C)	NGG1	5.86	-6.30	2	5.09	-3.86	2	5.94	-5.33	2	4.64	-3.86	2	5.41	-5.08	2
SAGA (C)	GCN5	5.68	-6.25	2	4.94	-4.11	2	5.59	-5.31	2	4.72	-3.42	2	5.38	-4.79	2
SWI/SNF	SWI1	5.16	-5.82	2	4.71	-3.77	2	5.20	-5.30	2	5.17	-4.80	2	4.58	-4.10	2
SAGA (C)	ADA2	5.68	-5.31	2	4.47	-3.98	2	5.32	-5.27	2	4.77	-3.98	2	5.03	-4.26	2
SAGA (C)	SGF29	5.59	-6.44	2	4.81	-4.32	2	5.29	-5.24	2	4.52	-3.86	2	5.00	-5.20	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	SUB1	6.05	-5.00	2	6.00	-3.45	2	6.98	-5.09	2	6.43	-5.38	2	6.17	-4.10	2
Pol I II III (C)	RPAB1	6.24	-4.25	2	6.29	-3.92	2	6.91	-5.04	2	6.90	-4.72	2	6.27	-2.03	2
Polymerase II (C)	RPB7	5.83	-6.92	2	5.74	-5.47	2	7.05	-4.94	2	6.56	-6.99	2	5.89	-5.14	2
TFIID /SAGA	TAF6	5.83	-5.91	2	5.58	-2.83	2	6.00	-4.93	2	5.23	-3.04	2	5.24	-3.13	2
SAGA (C)	SPT3	5.50	-6.07	2	5.29	-4.56	2	5.87	-4.89	2	4.91	-3.78	2	5.19	-5.01	2
SWI/SNF	SNF2	5.28	-5.21	2	4.91	-3.50	2	5.28	-4.86	2	5.05	-3.86	2	4.42	-3.77	2
SAGA (C)	SGF73	5.75	-5.99	2	5.00	-4.49	2	5.74	-4.83	2	5.04	-3.74	2	5.55	-5.12	2
TFIID /SAGA	TAF12	6.06	-6.24	2	5.45	-3.63	2	6.14	-4.80	2	5.49	-3.63	2	5.71	-4.62	2
Elongation (F)	TFS2	5.56	-4.20	2	5.73	-2.71	2	6.51	-4.78	2	6.27	-6.17	2	5.67	-5.01	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	HSF	5.10	-5.69	2	5.18	-4.59	2	5.51	-4.76	2	5.60	-5.40	2	5.64	-5.73	2
Pol I II III (C)	RPAB3	5.97	-4.14	2	6.04	-3.60	2	7.18	-4.71	2	6.58	-4.18	2	5.93	-2.96	2
TFIID /SAGA	TAF5	5.70	-5.86	2	5.14	-2.97	2	5.99	-4.61	2	5.40	-3.23	2	5.43	-3.85	2
SWI/SNF	SNF5	5.63	-5.06	2	5.30	-2.90	2	5.86	-4.55	2	5.35	-4.98	2	5.16	-3.06	2
SWI/SNF	SWI3	5.72	-4.92	2	5.35	-2.87	2	5.75	-4.33	2	5.68	-4.44	2	5.31	-3.30	2
SWI/SNF	SNF12	5.62	-4.78	2	4.58	-2.86	2	5.68	-4.25	2	5.15	-4.18	2	4.92	-3.78	2
Pol I II III (C)	RPAB2	6.53	-3.96	2	6.60	-2.58	2	7.52	-4.15	2	6.57	-4.51	2	6.43	-2.08	2
SWI/SNF	SWP82	4.84	-4.35	2	4.47	-2.86	2	5.06	-4.03	2	4.88	-4.16	2	4.72	-3.19	2
SAGA (C)	SPT8	5.68	-5.98	2	4.91	-3.66	2	5.38	-3.93	2	4.91	-2.96	2	5.47	-3.97	2
TFIID (C)	TAF4	4.25	-4.29	2	4.69	-1.95	2	5.39	-3.87	2	4.53	-3.56	2	3.66	-1.61	2
TFIID /SAGA	TAF10	5.94	-3.81	2	5.66	-1.84	2	5.98	-3.75	2	5.75	-2.33	2	5.73	-3.65	2

		Med5-HA			Med1-HA			Med17-HA			Med2-HA			Med19-HA		
Pol I III (C)	RPAB4	6.66	-3.80	2	6.48	-2.20	2	7.14	-3.75	2	6.62	-3.32	2	6.32	-1.95	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	MET4	4.28	-3.12	2	4.47	-1.72	2	4.58	-3.47	2	4.33	-1.20	2	4.19	-2.58	2
SWI/SNF und RSC	ARP7	4.88	-3.35	2	4.66	-1.49	2	4.87	-2.93	2	4.69	-3.12	2	4.49	-1.55	2
SWI/SNF und RSC	ARP9	5.27	-3.46	2	4.93	-1.23	2	5.42	-2.88	2	5.26	-2.45	2	5.11	-1.85	2
	BUD27	4.31	-2.28	2	4.31	-1.26	2	4.88	-2.82	2	3.93	-2.13	2	4.11	-2.20	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	SKN7	4.99	-4.55	2	4.74	-1.50	2	5.16	-2.50	2	4.42	-2.52	2	5.23	-2.82	2
	RNQ1	5.62	-2.25	2	5.74	-1.57	2	5.74	-2.02	2	5.67	-1.19	2	5.58	-1.32	2
Elongation (F)	SPT6	4.68	-2.71	2	5.08	-1.40	2	5.05	-2.00	2	4.87	-1.41	2	4.45	-1.50	2
SWI/SNF	RT102	4.92	-5.81	2	5.26	-2.03	2	5.68	-1.50	2	5.06	-3.44	2	5.06	-4.12	2
TFIID (C)	TAF2	3.76	-4.47	2	3.68	-2.53	2	4.25	-4.21	2	4.24	-1.75	2	3.10	-1.16	1
Chromatin Remodeling (F)	TOP2	3.80	-5.05	2	3.81	-1.24	1	4.39	-3.73	2	4.59	-0.91	2	3.61	-1.78	2
TFIIE (C)	T2EB	4.50	-4.02	2	4.48	-1.08	1	5.63	-2.38	2	4.61	-3.82	2	4.14	-3.41	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	GCN4	4.68	-4.39	2				4.86	-5.66	2	5.15	-5.00	2	4.96	-5.06	2
TFIID (C)	TAF1	4.48	-5.35	2				5.35	-4.75	2	4.76	-3.69	2	3.86	-2.41	2
SAGA (C)	UBP8	5.05	-6.62	2				4.69	-4.60	2	4.34	-3.55	2	4.46	-4.63	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	CRZ1	4.51	-4.09	2				5.47	-4.04	2	4.81	-3.51	2	4.38	-3.53	2
	LIC4	4.84	-5.07	2				4.83	-3.96	2	5.00	-4.13	2	4.28	-4.23	2
Importin	IMA1	6.13	-5.67	2	5.35	-0.95	2	6.55	-3.88	2	6.16	-3.53	2	4.31	-1.03	0
TFIID /SAGA	TAF9	5.81	-5.17	2				5.80	-3.84	2	5.20	-3.54	2	5.39	-3.36	2
SWI/SNF	SNF6	5.10	-4.28	2				5.36	-3.70	2	5.27	-3.35	2	4.39	-2.41	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	GAT1	5.09	-2.06	2	5.08	-0.52	0	5.38	-3.60	2	5.42	-1.54	2	4.85	-1.48	2
Pol I III (C)	RPAB5	5.69	-2.77	2				7.23	-3.40	2	5.75	-2.93	2	5.58	-1.47	2
	RTR1	4.45	-4.88	2	4.70	-2.57	2	5.14	-3.37	2				3.69	-2.87	2
SAGA (C)	SUS1	4.86	-5.73	2	5.17	-2.36	2	5.17	-3.26	2				4.71	-3.63	2
eIF4G (C)	IF4F2	4.87	-3.13	2	4.60	-1.44	2	5.23	-3.08	2	4.22	-1.14	2	3.87	-0.38	0
RSC Komplex	STH1	3.83	-3.36	2	4.14	-0.92	2	4.31	-3.07	2	4.33	-1.62	2	4.09	-0.88	0
	TAO3	2.81	-3.24	2				3.11	-2.95	2	2.89	-1.10	2	3.17	-1.74	2
Transkriptions-aktivatoren (F)	ASG1	5.46	-2.13	2	4.76	-0.26	0	5.07	-2.50	2	4.67	-1.44	2	5.16	-2.06	2
IMDH	IMDH3	6.61	-3.42	2	6.52	-0.96	2	6.84	-2.48	2	6.46	-1.59	2	6.04	-0.23	0
Transkriptions-aktivatoren (F)	MSN2	5.02	-2.10	2	4.97	-0.65	0	5.60	-2.47	2	5.12	-2.24	2	4.64	-2.07	2
Polymerase III (C)	RPC1	4.02	-2.82	2	4.09	-2.97	2	4.08	-2.45	2	4.03	-1.02	0	3.37	-1.47	2
IMDH	IMDH4	6.21	-3.48	2	6.21	-1.05	2	6.43	-2.45	2	6.21	-1.76	2	5.86	-0.25	0
Pol I Transkription	HMO1	5.91	-1.97	2	6.35	-1.79	2	6.52	-2.31	2	5.85	-0.83	2	6.21	0.60	0
IMDH	IMDH2	6.47	-3.26	2	6.37	-0.92	2	6.69	-2.21	2	6.39	-1.67	2	6.03	-0.13	0
Set3 complex	HOS4	3.79	-3.90	2	4.56	-3.16	2	4.14	-2.21	2	4.61	-2.76	2	3.94	0.47	0
mRNA Prozessierung (F)	VTS1	4.72	-2.31	2				4.79	-2.08	2	4.36	-2.36	2	4.18	-1.65	2

Transposon	YL21B	4.41	-2.91	2	4.68	-1.03	2	4.67	-2.80	2						
SWR1 Komplex	BDF1	4.23	-2.61	2	4.55	-0.83	0	4.95	-2.71	2	4.08	-1.83	2	4.80	0.66	0
	PAM1	3.54	-1.67	2				4.37	-2.66	2				4.06	-1.66	2
NuA4 Komplex	SWC4	4.13	-1.97	2				4.14	-2.66	2	4.13	-1.27	2			
Ribosomen Biogenese	TOD6	4.37	-2.34	2				3.44	-2.65	2	3.82	-1.26	2	3.51	-0.71	0
	BAS1	4.18	-4.23	2				4.03	-2.57	2	3.89	-3.10	2			
Zytoplasma (O)	FDFT	4.44	-2.90	2	4.53	-0.67	0	4.12	-2.54	2	5.20	0.04	0	3.95	-2.47	2
	TBF1	4.15	-3.76	2				4.61	-2.44	2	4.58	-2.17	2			
Ribosomen Biogenese	RRP12	4.71	-4.28	2	4.18	-0.79	1	4.59	-2.43	2	5.04	-0.73	1	4.63	-0.68	0
	GDS1	4.79	-3.68	2				4.65	-2.41	2				4.09	-3.59	2
Transposon	YO11A	6.39	-2.36	2	6.57	-0.85	1	6.72	-2.31	2	6.66	-0.85	1	6.11	-0.24	0
Ribosomen Biogenese	MAK5	3.87	-3.57	2				4.13	-2.30	2	5.01	-1.03	2			
Zytoplasma (O)	PHO88	5.77	-2.65	2	5.37	-0.40	0	5.56	-2.25	2	5.87	-0.12	0	4.64	-1.81	2
Zytoplasma (O)	STE24	4.16	-2.49	2				4.24	-2.11	2	5.06	-0.10	0	4.10	-2.25	2
Mitochondrial	ODC2	4.41	-2.32	2	4.68	0.37	0	4.35	-1.87	2	5.23	0.23	0	4.29	-1.42	2
	PABP	6.38	-2.68	2	6.36	-0.57	0	7.06	-1.81	2	6.22	-1.24	2	5.69	-0.57	0
mRNA Prozessierung (F)	EDC3	4.39	-1.99	2				4.84	-1.80	2	4.31	-1.19	2			
Mitochondrial	MG101	4.84	-2.98	2	5.08	-0.30	0	5.42	-1.72	2	4.96	-1.06	2	4.52	-0.08	0
60S (C)	RL18A	6.24	-2.77	2	6.49	-1.07	2	6.56	-1.67	2	6.25	-0.56	0	5.69	-0.62	0
Zytoplasma (O)	CHS1	4.43	-1.77	2				4.26	-1.61	2	3.91	-1.15	2			
	HXT1	4.41	-1.42	2	4.41	0.36	0	4.18	-1.59	2	4.64	-0.25	0	4.31	-2.25	2
60S (C)	RL12A	6.66	-2.69	2	7.06	-0.68	0	7.18	-1.57	2	6.66	-1.02	2	6.39	-0.81	0
mRNA Prozessierung (F)	DCP2	4.73	-1.36	2	5.00	-0.33	0	4.75	-1.48	2	4.49	-1.81	2	3.32	-0.29	0
Ribosomen Biogenese	PWP1	4.93	-2.50	2	5.22	-0.65	0	5.54	-1.47	2	4.98	-0.92	2	4.72	-0.65	0
60S (C)	RL15A	6.29	-2.87	2	6.81	-0.94	2	6.87	-1.43	2	6.20	-0.37	0	5.71	-0.50	0
60S (C)	RL15B	6.21	-2.99	2	6.75	-0.94	2	6.80	-1.33	2						
Zytoplasma (O)	ATC5	4.77	-1.99	2				4.41	-1.29	0	4.84	-0.79	2	4.31	-2.63	2
Ribosomen Biogenese	NOP4	4.76	-2.98	2	4.95	-0.53	0	5.15	-1.26	2	5.04	-0.82	2	4.21	-0.84	0
	GBP2	4.66	-3.41	2	4.21	-2.58	2	4.54	-1.17	2	3.93	-0.44	0			
60S (C)	RL25	6.87	-1.91	2	7.28	-0.58	1	7.44	-1.13	2	6.72	-0.78	1	6.43	-0.71	0
Zytoplasma (O)	FKS1	6.06	-1.59	2	5.67	-1.63	2	5.93	-0.93	0	5.86	-0.44	0	5.75	-2.60	2
Zytoplasma (O)	SNC1	6.08	-1.54	2	5.71	-1.87	2	5.77	-0.74	0	5.89	-0.50	0	5.01	-2.87	2
	RAF	4.56	-1.88	2				4.70	-3.77	2	4.50	-0.86	1	4.08	-0.84	0
S/T Proteinkinase (F)	GIN4	4.59	-3.73	2	4.04	-0.86	0	4.26	-3.53	2	3.47	-1.04	1	4.30	-0.05	0
Zytoskelet	TCB2	4.30	-3.75	2	3.57	-1.13	1	3.86	-3.30	2						
	STU2				3.45	-1.32	1	4.31	-2.88	2	4.17	-1.23	2	3.51	0.06	0
Pol I (C)	RPA1	5.81	-1.85	2	5.62	-0.69	1	6.33	-2.77	2	5.75	-0.35	0	5.81	0.73	0
Pol I (C)	RPA2	5.72	-1.83	2	5.44	-0.65	1	6.26	-2.69	2	5.77	-0.31	0	5.75	0.69	0

Ribosomen Biogenese	MDN1				4.14	-1.09	2	4.23	-2.66	2	3.50	-0.97	1			
mRNA Prozessierung (F)	RNA14	3.79	-2.59	2	3.33	-1.27	1	4.14	-2.30	2						
Histone	H3	6.30	-3.04	2	6.49	-0.84	1	6.47	-2.27	2	6.08	-0.40	0	5.64	-0.52	0
Transposon	YN12A	6.30	-2.35	2				6.71	-2.26	2	6.58	-0.84	1	6.10	-0.24	0
RSC Komplex	RSC3	5.78	-1.36	0	4.84	-3.53	2	5.86	-2.17	2	5.06	-0.59	1	5.19	-0.19	0
MBF SBF	SWI6	4.15	-2.25	2	3.83	-1.09	1	4.77	-2.11	2				3.75	-0.57	0
RSC Komplex	RSC9	3.71	-2.62	2	3.99	-0.80	0	4.24	-2.11	2	3.94	-0.94	1	3.70	-0.86	0
Translation	CLU	4.83	-1.93	2	5.27	-0.84	1	5.56	-2.08	2	5.36	-0.36	0	4.95	-0.33	0
Zytoplasma (O)	OSTB	4.53	-2.78	2				4.64	-1.86	2	4.89	0.12	0	4.19	-1.34	1
	AFT1	3.52	-3.10	2				4.00	-1.82	2	3.65	-1.03	1	3.70	-0.70	0
Ribosomen Biogenese	NOP2	4.67	-2.68	2	4.88	-0.75	1	5.33	-1.68	2	4.86	-0.59	0	4.07	-0.11	0
ISW1/2	ISW1	3.64	-3.17	2	4.39	-0.39	0	4.31	-1.67	2	3.87	-0.74	1	4.59	-0.58	0
60S (C)	RLA0	6.52	-2.52	2	7.00	-0.75	1	7.23	-1.61	2	6.73	-0.48	0	5.98	-0.92	0
Histone	H2AZ	5.94	-1.22	2	6.23	-0.62	0	6.24	-1.59	2	5.90	-0.61	1	5.60	0.30	0
60S (C)	RL3	6.16	-2.92	2	6.63	-0.87	1	6.85	-1.59	2	6.48	-0.54	0	5.93	-0.66	0
RSC Komplex	RSC6	3.79	-2.45	2	4.11	-0.12	0	4.08	-1.55	2	4.14	-0.92	1			
mRNA Prozessierung (F)	DXO	4.52	-1.10	2	3.94	-0.54	0	4.05	-1.48	2	3.94	-0.92	1	4.32	0.28	0
Ribosomen Biogenese	RIX1	3.32	-1.77	2	3.82	-0.09	0	4.19	-1.46	2	4.69	-0.68	1	3.76	0.29	0
INO80	INO80	3.57	-2.43	2	3.62	-0.80	0	3.70	-1.46	2	3.31	-0.20	0	3.69	-1.08	1
mRNA Prozessierung (F)	NAM7	5.46	-1.08	1	5.75	-0.81	1	5.76	-1.45	2	5.49	-0.60	1	5.02	0.26	0
SEA Komplex	SEH1	4.76	-1.47	2	4.44	-0.46	0	4.27	-1.44	2	4.84	-0.68	1	4.59	0.06	0
Histone	H2B2	6.63	-1.52	2	6.73	-0.79	1	7.00	-1.40	2	6.63	-0.65	0	5.91	-0.07	0
RSC Komplex	RSC8	4.53	-2.33	2	5.03	-0.51	0	5.07	-1.40	1	4.68	-1.07	2	4.28	-0.71	0
60S (C)	RL14B	6.49	-2.01	2	6.83	-0.64	1	6.87	-1.23	2	6.34	-0.48	0	5.95	-0.12	0
Ribosomen Biogenese	NIP7	4.73	-1.18	2	5.38	-0.55	0	5.42	-1.21	1	5.21	-0.93	2	4.96	0.23	0
60S (C)	RL14A	6.51	-2.02	2	6.86	-0.67	1	6.87	-1.20	2	6.38	-0.54	0	5.96	-0.12	0
Zytoplasma (O)	KRE6	5.42	-1.36	2	5.35	-1.22	0	5.39	-1.13	1	5.36	-0.30	0	4.60	-2.17	2
Ribosomen Biogenese	NOP12	5.07	-3.41	2	5.20	-0.50	0	5.41	-1.07	1	5.09	-0.76	2	4.58	-1.00	0
Ribosomen Biogenese	LSM4	4.39	-1.29	2	5.00	0.04	0	5.40	-1.03	2	4.46	-0.81	1			
60S (C)	RLA4	5.78	-1.76	2	6.76	-0.10	0	6.73	-0.41	0	5.53	-1.63	2	5.17	-1.37	1
Transposon	YL14B	5.77	-2.60	2	5.98	-0.91	2				6.05	-0.95	1			
Transposon	YP14B	5.77	-2.60	2	5.98	-0.91	2				6.04	-0.95	1	5.53	-0.40	0
CBF3 (C)	CBF3A	3.66	-3.60	2				3.57	-5.17	2						
Transkriptions-aktivatoren (F)	FZF1							4.96	-4.52	2	5.01	-5.06	2			
mRNA Prozessierung (F)	CBP2	4.53	-4.80	2				3.82	-4.46	2						
NuA4 Komplex	EPL1	3.37	-3.72	2				3.68	-4.46	2						

		Med5-HA			Med1-HA			Med17-HA			Med2-HA			Med19-HA		
UAF	RRN5	3.14	-3.31	2				3.93	-4.23	2						
	ECM32	3.63	-4.43	2				3.37	-4.01	2	3.45	0.87	0			
NuA4 Komplex	EAF1	4.19	-4.41	2				4.50	-4.00	2						
	RGC1	4.12	-3.25	2	3.39	-0.33	0	4.44	-3.75	2	4.22	-0.39	0	4.27	0.07	0
RENT Komplex	SIR2	4.42	-2.57	2				5.24	-3.73	2						
TFIIH (C)	TFB2	4.30	-3.17	2				4.35	-3.68	2						
	RIF1	2.78	-4.04	2				3.30	-3.67	2						
Replikation	TOF2	4.62	-3.16	2				4.52	-3.58	2				3.79	0.19	0
TFIIH (C)	RAD25							4.23	-3.50	2	3.31	-2.11	2			
TFIID (C)	TAF8							5.07	-3.47	2	4.13	-2.21	2			
	IBD2	3.93	-1.48	2				4.53	-3.29	2						
mRNA Prozessierung (F)	SF3B1	2.81	-3.64	2				3.64	-3.26	2						
Mitochondrial	OAC1	4.38	-3.56	2	4.54	0.40	0	3.98	-3.25	2	4.87	0.12	0	4.37	-1.15	0
TFIIE (C)	T2EA							5.32	-3.18	2	4.18	-3.69	2			
	LRS4	3.82	-2.50	2				4.23	-3.07	2						
	NST1	3.52	-3.39	2				3.95	-3.05	2				3.73	-0.43	0
TFIID (C)	TAF13	4.20	-3.31	2				4.71	-3.03	2						
	SIR3	3.23	-2.47	2				3.98	-2.95	2						
TRAMP	AIR1	4.25	-3.25	2				4.39	-2.91	2						
	BDF2	3.32	-3.12	2				4.21	-2.86	2						
Mitochondrial	GGC1	4.29	-2.60	2	4.41	0.28	0	3.95	-2.83	2	5.03	0.22	0	4.24	-1.29	0
	YN8B	4.20	-2.49	2				4.31	-2.83	2	5.24	0.16	0			
THO/TREX complex	HPR1	4.20	-3.07	2				4.16	-2.76	2						
TFIIH (C)	CCL1	3.78	-3.52	2				4.53	-2.75	2						
RSC Komplex	RSC2	3.22	-3.10	2	3.50	-1.27	1	4.20	-2.72	0	4.02	-1.03	1	3.29	-0.75	0
	REP1	4.21	-1.45	2	4.37	-0.45	0	5.27	-2.70	2	4.57	-0.49	0			
Zytoplasma (O)	NCPR	4.50	-2.34	2	4.59	-0.04	0	4.74	-2.68	2	5.36	0.19	0	4.35	-1.10	0
Mitochondrial	MCX1	4.15	0.33	0	4.49	-0.24	0	4.55	-2.66	2	4.91	-2.03	2	4.43	0.41	0
Zytoplasma (O)	PMT2	4.31	-3.16	2	4.15	0.09	0	4.22	-2.65	2	5.12	0.14	0	4.15	-1.03	0
Zytoskellet	MYO2	4.86	-2.64	2	4.31	-0.24	0	5.20	-2.64	2	4.49	-0.31	0	4.37	0.09	0
Ribosomen Biogenese	XPO1	3.48	-1.80	2	4.14	-0.55	0	3.65	-2.64	2	4.42	-0.16	0	4.01	-0.26	0
TFIIIB	TF3B	3.75	-1.53	2				3.80	-2.63	2				3.85	-0.58	0
S/T Proteinkinasen (F)	KIC1							4.21	-2.61	2	3.75	-3.24	2			
Transkriptions- aktivatoren (F)	MSN4	3.91	-3.02	2	4.08	-0.76	0	4.48	-2.60	2						
Replikation	DNLI1							4.16	-2.60	2	4.23	-1.46	2	4.18	0.41	0
Zytoplasma (O)	SGPL	3.24	-3.24	2	3.61	-0.05	0	3.42	-2.57	2						
Zytoplasma (O)	ADT2	5.15	-2.09	2	5.51	0.15	0	5.04	-2.53	2	5.47	0.30	0	5.11	-0.13	0
Golgi (O)	SEC63	4.46	-3.24	2	4.50	0.03	0	4.25	-2.53	2	5.21	-0.09	0	3.35	-0.39	0
	EMC1	3.86	-2.95	2	3.51	0.29	0	4.15	-2.52	2	4.38	-0.29	0			

	SSH1	4.61	-2.56	2	5.08	-0.06	0	4.65	-2.49	2	5.13	0.00	0			
	YOP1	5.53	-2.40	2	5.59	-0.09	0	5.52	-2.48	2	6.14	0.14	0	4.70	0.09	0
	TMEDA	5.04	-1.82	2				5.63	-2.47	2	5.55	0.16	0	4.25	-0.58	0
Kontrolle der Zellteilung (F)	CDC24							4.14	-2.45	2	4.08	-1.81	2	3.67	0.29	0
TFIID (C)	TBP	4.27	-2.98	2				4.81	-2.39	2						
Zytoplasma (O)	MCFS2	4.38	-1.62	2	4.53	0.18	0	4.65	-2.39	2	5.12	0.27	0			
	YP089				4.07	-0.42	0	4.51	-2.36	2	4.28	-1.08	2	4.32	0.19	0
Pol I (C)	RPA43	5.49	-1.81	2	5.59	0.15	0	6.25	-2.32	2	5.46	-0.28	0	5.51	0.75	0
ISW1/2	IOC2	3.88	-3.47	2				4.20	-2.32	2	4.35	-0.64	0	3.23	-0.40	0
Golgi (O)	SC61A	4.14	-2.36	2				4.90	-2.31	2	4.78	0.09	0			
Zytoplasma (O)	ERG3	4.16	-3.20	2	4.67	-0.27	0	4.54	-2.31	2	4.62	0.01	0			
	SLF1	4.01	-3.95	2	3.88	-0.41	0	4.19	-2.30	2						
Polymerase I III (C)	RPAC1	5.84	-1.68	2	5.56	-0.35	0	6.40	-2.28	2	5.59	-0.30	0	5.80	0.64	0
Mitochondrial	FSF1	4.29	-3.16	2	4.48	0.27	0	4.06	-2.28	2	4.55	-0.25	0			
Zytoplasma (O)	SAC1	4.57	-2.62	2	4.72	-0.29	0	4.68	-2.27	2	4.90	-0.01	0	4.31	-1.31	0
	GSF2	4.31	-2.42	2	4.58	0.01	0	4.26	-2.26	2	5.27	-0.05	0	4.07	0.01	0
nucleoporin	NU116	4.34	-2.14	2	4.46	-0.33	0	3.58	-2.26	2						
	PGA2	4.94	-2.62	2				4.92	-2.25	2	5.31	-0.01	0			
Replikation	RFC1	3.93	-3.00	2	4.01	-0.68	0	4.18	-2.24	2	3.74	-0.52	0	3.82	-0.92	0
S/T Proteinkinasen (F)	TOR2	3.32	-3.57	2	2.78	-0.11	0	3.22	-2.19	2						
Polymerase III (C)	RPC2	3.42	-2.09	2	3.73	-0.97	0	4.21	-2.17	2				3.75	-0.71	0
	SPA2	4.09	0.07	0	4.51	-0.04	0	4.73	-2.16	2	4.37	-2.31	2	4.19	0.23	0
Ribosomen Biogenese	RIX7				4.24	-0.46	0	4.39	-2.16	2	4.59	-1.31	2	3.98	0.13	0
HIR Komplex	HIR2	3.63	-3.40	2				4.20	-2.14	2						
IMDH	IMDH1	6.31	-3.30	2				6.56	-2.09	2						
	RTN1	5.98	-2.07	2	5.54	-0.10	0	5.85	-2.09	2	5.88	-0.22	0	5.67	0.09	0
Pol I (C)	RPA12	5.91	-1.77	2	6.04	-0.18	0	6.50	-2.09	2	5.85	-0.27	0	5.81	0.85	0
mRNA Prozessierung (F)	BRR2	3.28	-1.96	2	3.38	-1.06	0	3.52	-2.06	2	3.22	-0.25	0	3.09	-0.43	0
	YET1	4.82	-2.56	2				4.64	-2.05	2	4.96	0.29	0			
	GCN1	4.05	-1.22	2	4.41	-0.72	0	4.64	-2.05	2	4.53	-0.08	0	4.59	0.04	0
Polymerase I III (C)	RPAC2	5.92	-1.65	2	5.91	-0.22	0	6.67	-2.01	2	5.60	-0.30	0	5.78	0.74	0
	VATD	4.82	0.00	0	5.70	-0.43	0	6.38	-2.00	2	5.52	-0.97	2	5.03	0.12	0
	ERV46	4.46	-1.00	2	4.65	-0.08	0	5.33	-1.99	2	5.04	-0.09	0	4.09	-0.40	0
Zytoplasma (O)	YHM2	5.12	-1.92	2	5.09	0.03	0	4.71	-1.98	2	5.93	-0.08	0	4.29	0.00	0
Zytoplasma (O)	DPM1	5.13	-2.52	2	5.21	-0.16	0	5.09	-1.94	2	5.91	0.05	0			
INO80	IES1	4.15	-2.03	2				3.89	-1.93	2				3.77	-0.69	0
	JIP5	4.02	-3.14	2				4.42	-1.90	2						
	PMA1	6.23	-1.42	2	6.58	-0.12	0	6.23	-1.89	2	6.75	0.31	0	6.07	0.07	0
	HXT3	5.03	-1.72	2	5.20	-0.30	0	4.88	-1.88	2	5.23	-0.02	0	4.60	0.18	0

		Med5-HA			Med1-HA			Med17-HA			Med2-HA			Med19-HA		
	VTC2	3.98	-1.88	2				4.53	-1.86	2	4.18	-0.13	0			
nucleoporin	NIC96	3.66	-1.16	2				3.91	-1.85	2	4.28	-0.19	0	3.07	-0.05	0
Mitochondrial	MS116	4.81	-1.57	2	4.13	0.08	0	4.34	-1.85	2	4.68	-0.26	0	4.27	0.38	0
Replikation	PAT1	4.20	-2.11	2	4.50	-0.50	0	5.23	-1.85	2	4.30	-0.62	0	4.07	-0.67	0
Histone	H4	6.28	-2.53	2	6.64	-0.57	0	6.80	-1.82	2	6.26	-0.44	0	5.69	-0.34	0
small subunit processome	UTP23	4.26	-3.02	2	4.35	-0.30	0	4.08	-1.80	2						
Pol I (C)	RPA14	5.50	-1.27	2	5.70	0.01	0	6.66	-1.80	2	5.32	-0.40	0	5.48	0.92	0
Zytoplasma (O)	ALO	4.51	-1.56	2	4.53	-0.08	0	4.43	-1.80	2	4.89	-0.01	0			
Zytoplasma (O)	ERG1	4.13	-1.64	2	4.06	0.10	0	3.80	-1.79	2	4.14	0.18	0			
small subunit processome	UTP20	3.74	-2.54	2	3.66	-0.81	0	4.12	-1.75	2	3.73	-0.34	0	3.29	-0.67	0
DNA Reparatur (F)	RAD59							4.59	-1.70	2	4.19	-1.23	2	3.43	0.43	0
RSC Komplex	RSC4	4.01	-2.48	0	3.88	-0.20	0	3.89	-1.70	2	4.17	-1.22	2			
repressor	FKBP4	4.90	-1.69	2	4.69	-0.66	0	5.18	-1.67	2	5.08	-0.30	0	5.46	0.43	0
Ribosomen Biogenese	ENP1	4.68	-1.06	2	4.93	-0.15	0	4.80	-1.67	2	4.78	-0.38	0	4.80	0.47	0
Zytoplasma (O)	ERG6	5.37	-1.45	2	5.34	0.07	0	5.45	-1.66	2	5.74	0.22	0	4.12	0.09	0
	SCS2	5.85	-2.28	2	5.85	0.05	0	5.81	-1.65	2	5.62	0.11	0	5.46	-0.79	0
Mitochondrial	TRM1	4.20	-1.76	2	4.01	-0.31	0	4.37	-1.64	2	4.74	-0.30	0	4.17	-0.21	0
Mitochondrial	C1TM	4.38	-1.35	2	5.12	-0.15	0	5.19	-1.63	2	5.22	-0.36	0	4.55	-0.01	0
S/T Proteinkinasen (F)	2A5D				4.33	-0.13	0	3.99	-1.62	2	3.41	-1.47	2			
Ribosomen Biogenese	NOC3	4.24	-1.12	2	4.18	-0.40	0	4.46	-1.62	2	4.19	-0.15	0	4.46	0.58	0
	TOM1	2.83	-1.97	2	3.32	-0.54	0	3.03	-1.58	2	3.35	-0.69	0	2.76	-0.25	0
NuA4 Komplex	EAF3	3.80	-1.26	2	4.44	-0.55	0	4.73	-1.57	2				3.82	0.11	0
mRNA Prozessierung (F)	PUF3	4.41	-1.28	2	4.34	-0.12	0	4.68	-1.56	2	4.45	-0.48	0	4.52	-0.08	0
	BRE5	4.73	-1.64	2	4.81	-0.34	0	4.52	-1.55	2	4.41	-0.48	0	4.07	-0.10	0
Golgi (O)	AP3S	5.11	0.20	0				5.06	-1.52	2	4.91	-1.92	2	4.83	0.18	0
Mitochondrial	TOM40	4.37	-1.48	2				4.55	-1.50	2	5.82	0.09	0	4.70	-0.91	0
Golgi (O)	EXO84							4.35	-1.50	2	4.06	-1.43	2	3.55	0.14	0
Golgi (O)	VPS1	5.06	-1.23	2	5.59	0.46	0	5.86	-1.50	2	5.38	-0.49	0	5.54	-0.74	0
mRNA Prozessierung (F)	WHI3	4.59	-0.24	0	4.91	-0.05	0	5.23	-1.46	2	4.74	-1.02	2	4.44	-0.32	0
Replikation	RFC3	4.51	-1.82	2	4.11	0.16	0	4.87	-1.45	2				4.09	0.02	0
small subunit processome	NOP14	3.57	-1.70	2	4.31	-0.78	0	4.86	-1.45	2	4.67	-0.45	0	4.25	0.02	0
repressor	FKBP3	5.68	-1.63	2	5.64	-0.48	0	6.02	-1.44	2	5.45	-0.29	0	6.07	0.42	0
	LSM1	4.60	-1.99	2				4.68	-1.41	2						
Ribosomen Biogenese	RPF2	4.73	-2.80	2				5.18	-1.40	2	4.50	-0.93	0	4.59	-0.69	0
DNA Polymerase	DPOE	3.13	-2.03	2				3.48	-1.39	2						

TRAMP	MTR4	4.22	-1.79	2	4.21	-0.57	0	4.61	-1.37	1	4.57	-0.72	1	4.04	-0.12	0
Ribosomen Biogenese	DRS1	3.22	-2.89	2	4.28	-0.43	0	4.03	-1.36	2						
	POP2	4.45	0.22	0	5.00	-0.56	0	4.85	-1.33	2	4.64	-1.40	2	4.29	0.27	0
Mitochondrial	IDH1	5.38	0.67	0	6.25	-0.41	0	6.70	-1.33	2	5.78	-1.36	2	5.73	0.27	0
Ribosomen Biogenese	NEP1	3.98	-1.70	2				5.81	-1.31	2						
Zytoplasma (O)	MNN2	4.22	-1.95	2	4.15	0.39	0	4.29	-1.28	2	4.24	0.10	0			
	VPH1	5.05	-1.38	2	4.95	0.00	0	4.75	-1.25	2	5.45	-0.11	0	5.48	0.15	0
Zytoplasma (O)	DPH2				4.77	0.20	0	4.88	-1.24	2	4.11	-1.45	2	3.94	0.32	0
nucleoporin	NU159	3.53	-1.55	2	4.25	0.42	0	4.21	-1.24	2	3.92	-0.48	0	2.95	0.49	0
Replikation	RFC2	4.67	-1.35	2	4.43	-0.20	0	4.78	-1.24	2	4.12	-0.54	0	4.50	0.04	0
Ribosomen Biogenese	NOG1	4.80	-2.16	2	5.08	-0.33	0	5.46	-1.21	2	5.62	-0.45	0	5.33	0.15	0
RSC Komplex	RSC7	4.57	-1.30	2	4.68	-0.34	0	4.72	-1.19	2	4.70	-0.42	0	4.38	-0.12	0
THO/TREX complex	YRA1	5.77	-1.34	2	6.09	-0.19	0	6.38	-1.18	2	6.13	-0.44	0	5.48	0.20	0
Ribosomen Biogenese	BMS1	3.88	-1.32	2	4.30	-0.29	0	4.36	-1.11	2	4.21	0.17	0	4.10	-0.16	0
	SFT2	5.50	-2.00	2	5.75	0.20	0	4.96	-1.10	2	6.30	-0.39	0			
	SIN3	3.99	-1.20	2	4.25	-0.36	0	4.29	-1.10	2	3.62	-0.48	0	3.61	-0.39	0
Zytoplasma (O)	LEM3	4.65	-2.06	2				4.35	-1.09	0	4.50	-0.33	0	4.50	-1.81	2
Ribosomen Biogenese	LOC1	5.00	-1.42	2	5.09	-0.09	0	5.09	-1.07	2				4.94	0.67	0
mRNA Prozessierung (F)	YSH1				3.85	-0.29	0	4.22	-1.03	2	4.00	-1.80	2	3.65	-0.12	0
mRNA Prozessierung (F)	MRN1	3.96	-2.42	2	4.11	-0.36	0	4.60	-0.93	2						
Ribosomen Biogenese	MRT4	4.98	-2.03	2	5.54	-0.41	0	5.54	-0.87	1	5.22	-0.57	1	4.85	-0.23	0
INO80	NHP10	4.23	-1.52	2	4.37	-0.26	0	4.82	-0.81	0	4.45	-1.65	2			
60S (C)	RL30	6.28	-1.69	2	6.67	-0.71	1	7.01	-0.71	0	6.13	-0.52	1	5.87	0.17	0
Transkriptions-aktivatoren (F)	IWS1	4.54	-1.47	2	4.80	-0.73	0	5.45	-0.64	0	4.58	-1.20	2	4.42	-0.34	0
	RHO3	4.29	-1.33	2	4.53	0.05	0	4.62	-0.60	0	5.04	0.05	0	4.09	-1.89	2
	SPT5	5.24	-1.04	1	5.38	-0.57	1	5.82	-0.60	0	5.07	-1.05	2	5.31	-0.67	0
Golgi (O)	YIP5	5.17	-1.05	2	4.93	-1.06	2	5.28	-0.52	0	5.08	-0.28	0			
	SSO1	5.14	-1.38	2				4.82	-0.49	0	4.98	-0.31	0	4.73	-1.79	2
	YM8V	6.26	-1.17	2	6.02	-0.14	0	6.48	-0.32	0	5.98	0.02	0	6.04	-2.54	2
Kontrolle der Zellteilung (F)	CDC73	4.60	-4.29	2	5.17	0.20	0	5.05	-0.10	0	4.79	-2.54	2	4.86	-1.03	0
MBF SBF	SWI4	3.12	-3.32	2										3.70	-1.94	2
SEA Komplex	IML1	3.45	-2.70	2	3.28	-0.60	0				2.90	-1.71	2	3.49	0.19	0
TRAMP	PAP2	3.71	-2.47	2							3.52	-1.17	2			
	NCE2	5.43	-1.47	2	5.58	0.33	0				5.92	0.18	0	5.19	-1.45	2
mRNA Prozessierung (F)	PUF2	4.25	-1.15	2							3.39	-1.13	2			
	YL108	3.65	-2.30	2										4.28	-2.17	2

Transposon	YN11A	5.72	-1.75	2	5.90	-0.85	1				5.94	-0.87	1	5.27	-0.54	0
		Med5-HA			Med1-HA			Med17-HA			Med2-HA			Med19-HA		
	ATC4	3.64	-1.81	2										3.30	-3.27	2
	MSN5							3.28	-3.67	2				3.32	-1.13	1
Transposon	YC21B				4.69	-0.85	1	4.69	-2.80	2	4.56	-0.48	0	4.01	-0.69	0
CCR4-NOT (C)	NOT1	3.90	-0.65	0	4.53	-0.98	0	4.51	-2.04	2	4.20	-0.73	1	3.70	-0.13	0
Zytoplasma (O)	TKT1	5.32	-1.09	1	5.40	-0.45	0	5.38	-1.83	2	5.62	-0.36	0	5.33	-0.23	0
Zytoplasma (O)	KHSE	5.26	0.10	0	7.05	-0.80	1	6.42	-1.59	2	5.66	-0.69	0	5.49	-0.08	0
Ribosomen Biogenese	MAK21	4.86	-2.36	2	4.99	-0.38	0	4.83	-1.39	1	4.74	-0.25	0	4.41	-0.02	0
Golgi (O)	MNN9	4.20	-1.25	2	4.09	0.22	0	4.24	-1.32	1	4.57	0.04	0	4.26	-0.64	0
Replikation	RFC4	4.16	-1.60	2	4.09	-0.23	0	4.03	-1.30	1						
TFIIIC (C)	TFC1	4.03	-1.26	1	3.92	-0.43	0	4.04	-1.25	2	3.86	-0.79	0	4.02	-0.82	0
small subunit processome	UTP10	4.09	-2.93	2	4.32	-0.40	0	4.45	-1.19	1	4.54	-0.13	0	4.08	0.08	0
	XRN2	4.61	-1.23	2	3.85	-0.64	0	4.23	-1.19	0	3.82	-0.86	1	4.20	-0.03	0
	PUF6	4.52	-2.22	2	4.43	-0.39	0	5.01	-1.17	1	4.53	-0.22	0	4.55	-0.30	0
Zytoplasma (O)	LYS1	4.67	-1.22	2	5.06	-0.10	0	5.57	-1.16	1	5.36	0.09	0	4.64	-0.29	0
60S (C)	RL27A	7.05	-1.11	1	7.42	-0.24	0	7.33	-1.16	2	6.86	-0.30	0	6.58	0.09	0
Ribosomen Biogenese	MAK16	4.56	-1.76	2				5.42	-1.14	1	4.76	-0.19	0	4.20	0.08	0
S/T Proteinkinasen (F)	PBS2	3.84	-1.34	0	4.44	0.10	0	5.14	-1.10	1	4.62	-1.31	2			
	TR120	3.59	-0.12	0				3.60	-1.08	0	3.86	-0.80	1	3.35	-2.11	2
	RAS2	4.47	-0.89	1	4.99	0.35	0	4.48	-1.07	2	4.84	0.18	0			
Ribosomen Biogenese	NOC2	4.57	-1.10	2	4.65	-0.35	0	4.99	-1.06	1	4.59	0.20	0	4.74	0.38	0
Ribosomen Biogenese	BRX1	5.22	-2.20	2	5.14	-0.69	0	5.81	-1.03	1	5.02	-0.55	0	4.96	-0.18	0
small subunit processome	UTP8	4.41	-1.98	2	4.58	-0.31	0	4.95	-0.99	1	4.49	-0.12	0	3.39	-0.18	0
Ribosomen Biogenese	EBP2	4.73	-2.40	2	4.94	-0.47	0	5.18	-0.97	1	4.65	-0.21	0	4.52	-0.10	0
small subunit processome	PWP2	3.65	-1.16	2	4.42	-0.18	0	4.68	-0.95	1	4.71	-0.04	0	3.50	-0.20	0
Ribosomen Biogenese	RRP5	5.22	-2.51	2	5.50	-0.30	0	5.71	-0.95	1	5.24	-0.32	0	4.79	-0.22	0
Zytoplasma (O)	GRP78	6.14	-1.47	2	6.43	-0.18	0	6.37	-0.94	1	6.38	-0.09	0	6.01	-0.37	0
Ribosomen Biogenese	RCL1	4.38	-1.40	2	4.32	-0.11	0	4.96	-0.93	1	3.93	-0.44	0	4.28	0.06	0
Mitochondrial	VDAC1	5.99	-1.39	2	5.95	-0.55	0	5.90	-0.91	1	6.39	0.23	0	5.38	-0.35	0
60S (C)	RL8B	6.30	-2.00	2	6.75	-0.61	1	6.91	-0.86	0	6.36	-0.23	0	5.84	-0.22	0
60S (C)	RL8A	6.27	-1.94	2	6.72	-0.61	1	6.91	-0.86	0	6.35	-0.26	0	5.84	-0.23	0
60S (C)	RL4B	6.32	-1.84	2	6.86	-0.70	1	7.27	-0.84	0	6.66	-0.30	0	6.06	-0.33	0
60S (C)	RL4A	6.39	-1.81	2	6.88	-0.70	1	7.28	-0.83	0	6.67	-0.29	0	6.11	-0.34	0
Ribosomen Biogenese	DBP4	4.34	-1.01	2	4.57	-0.28	0	4.93	-0.79	0	4.84	-0.52	1	4.30	0.03	0
Ribosomen Biogenese	RRS1	5.11	-1.64	2	5.62	-0.34	0	5.69	-0.66	0	5.11	-0.79	1			

Mitochondrial	RIM1	5.18	-1.44	2	5.69	0.35	0	5.41	-0.32	0	5.37	-0.56	1	5.23	-0.26	0
Ribosomen Biogenese	RRB1	4.73	-1.02	2	5.14	-0.11	0	4.92	-0.17	0	4.86	-0.60	1	5.24	-0.01	0
Histone	H2B1	6.67	-1.53	2	6.76	-0.79	1				6.67	-0.65	0	5.95	-0.07	0
	STE13	4.09	-1.47	2							4.02	-0.78	1			
S/T Proteinkinasen (F)	TOR1	2.69	-3.33	2							2.84	-1.06	1			
Zytoplasma (O)	SUL1	4.42	-1.41	2							4.55	-0.40	0	3.57	-1.05	1
	SHO1	4.54	-1.52	2										4.44	-1.10	1
	GIS2	3.74	-2.10	2							4.84	-0.84	1			
Replikation	CTF4				3.47	-1.23	1							3.74	-2.17	2
Transposon	YG12A	6.37	-2.35	2							6.59	-0.84	1			
	TRS33	4.94	-1.21	2	4.87	0.08	0				4.85	-0.64	1			
mRNA Prozessierung (F)	GFD1							7.13	-10.3	2						
Golgi (O)	SEC15							4.66	-4.76	2						
TFIIIC (C)	TFC3							3.85	-4.22	2						
	RER1							5.38	-3.88	2						
Transkriptionsaktivatoren (F)	MET32							4.33	-3.74	2						
Mitochondrial	MRM1							3.83	-3.60	2						
S/T Proteinkinasen (F)	KIN4							3.79	-3.57	2				3.57	-0.23	0
Replikation	FOB1							4.41	-3.51	2						
MBF SBF	MBP1							3.94	-3.50	2						
mRNA Prozessierung (F)	NMD2							3.74	-3.44	2				3.50	-0.09	0
	TEL2							3.42	-3.38	2						
Golgi (O)	SEC10							3.87	-3.37	2						
	YG34							4.36	-3.26	2						
Golgi (O)	COG3							3.67	-3.06	2				3.00	-0.07	0
	TBP7				3.89	2.85	-2	3.85	-3.03	2	4.61	-0.92	2			
S/T Proteinkinasen (F)	KSP1				3.78	-0.20	0	4.08	-3.00	2				3.99	-0.11	0
ISW1/2	ISW2				3.38	-0.20	0	3.67	-2.96	2	3.67	-0.66	0	3.36	-1.02	0
	PEX11							4.18	-2.94	2	4.69	-0.15	0			
Mitochondrial	YME2							3.08	-2.88	2						
	ORM1							4.29	-2.84	2						
Golgi (O)	COG8	3.40	0.11	0				4.53	-2.83	2						
	CSM1							4.87	-2.80	2						
Transposon	YB11B							5.53	-2.79	2						
	STU1							3.69	-2.78	2						
Zytoplasma (O)	ROD1	4.32	-0.74	0				4.62	-2.75	2	4.53	0.29	0	4.12	0.35	0
Golgi (O)	VPS53							3.63	-2.73	2						

	SPP41							3.72	-2.69	2						
Zytoplasma (O)	PEM2							4.77	-2.67	2	4.99	0.00	0			
		Med5-HA			Med1-HA			Med17-HA			Med2-HA			Med19-HA		
	SUM1							3.93	-2.62	2				3.66	-0.72	0
Transposon	YO11B							6.10	-2.56	2				5.50	-0.44	0
Transposon	YG11B							6.12	-2.49	2						
	FAF1							3.82	-2.49	2						
Mitochondrial	MPCP	5.02	-2.45	2	4.88	0.03	0	4.98	-2.48	0	5.98	0.40	0	4.27	0.11	0
	OCA6							4.01	-2.46	2						
Zellzyklus	PHO81							4.31	-2.45	2				3.66	0.03	0
Zytoplasma (O)	PET10	4.15	-0.92	0	4.31	-0.29	0	4.42	-2.43	2	4.83	0.47	0			
TFIIH (C)	TFB3							4.94	-2.42	2						
Golgi (O)	ERP1				4.96	0.09	0	5.10	-2.40	2	5.35	0.05	0			
	PDR5							3.42	-2.37	2	4.55	-0.12	0	3.75	-1.50	0
Importin	IMB3	4.06	-0.33	0	4.56	-0.33	0	4.55	-2.36	2	4.47	-0.49	0	4.42	-0.23	0
Golgi (O)	COG4							3.72	-2.33	2				3.45	0.17	0
mRNA Prozessierung (F)	SN114	4.10	-1.99	2				3.84	-2.30	0				3.23	-0.73	0
nucleoporin	NU133							3.87	-2.29	2				3.66	-0.25	0
Zytoplasma (O)	AAP1							3.52	-2.26	2	4.46	-0.24	0	3.94	-0.48	0
Golgi (O)	SEC22							5.62	-2.25	2	5.27	-0.05	0			
	VAC14							3.57	-2.22	2	3.60	-0.35	0			
	SFL1							4.09	-2.18	2						
Ribosomen Biogenese	RRP3	4.17	-0.21	0	4.47	-0.20	0	4.74	-2.10	2	4.87	-0.41	0	4.67	0.39	0
	DRE2							4.65	-2.08	2						
mRNA Prozessierung (F)	JSN1	3.62	-1.57	0				4.28	-2.02	2	3.63	0.95	0	4.24	-0.79	0
Zytoplasma (O)	DAL5							3.96	-2.02	2	5.20	0.35	0			
Zytoskelle	DNM1	3.68	-0.17	0	4.20	-0.37	0	4.85	-2.01	2	4.54	-0.28	0	4.47	-0.03	0
Golgi (O)	SEC7	3.35	-0.57	0	3.85	-0.32	0	4.41	-2.00	2	4.15	-0.44	0	4.05	-0.32	0
Mitochondrial	APE2	3.84	-0.68	0	4.31	-0.28	0	3.93	-2.00	2	4.71	-0.27	0	4.12	-0.19	0
	BNI4				4.02	-0.15	0	4.03	-1.99	0	3.75	-1.23	2			
	AP18A							5.06	-1.98	2				4.09	-0.05	0
	VID22							4.13	-1.98	2	3.92	-0.67	0			
Zytoplasma (O)	SYIC	4.85	-0.85	0	5.39	-0.32	0	4.72	-1.97	2	5.29	-0.14	0	4.85	-0.24	0
DNA Reparatur (F)	MSH2	3.67	-0.78	0	3.87	-0.23	0	3.87	-1.91	2	4.24	-0.72	0	3.90	0.15	0
	BOB1	4.88	0.31	0	4.33	0.56	0	4.19	-1.91	2	3.73	-0.67	0	5.11	0.57	0
Ribosomen Biogenese	SGD1	3.05	-0.99	0	3.67	-0.16	0	3.87	-1.89	2				3.84	0.33	0
Golgi (O)	GOSR1	4.66	-1.32	2				4.59	-1.88	0	4.90	0.01	0			
	YRB30				4.09	0.19	0	4.04	-1.87	2				3.73	0.40	0
Zytoplasma (O)	CHO2	4.08	-3.49	2	3.98	-0.18	0	4.30	-1.84	0	4.22	-0.21	0			

S/T Proteinkinasen (F)	KPC1							2.91	-1.74	2						
	FKH1							4.56	-1.74	2						
	BEM1							4.24	-1.71	2			3.76	0.38	0	
Zytoskelet	CIN8	3.84	-3.12	2				3.93	-1.68	0						
Zytoplasma (O)	KTR3	3.59	-1.62	0				4.76	-1.67	2	4.72	0.04	0	4.24	-0.38	0
T-complex	TCPH	4.99	0.29	0	5.61	-0.78	0	5.71	-1.67	2	5.45	-0.72	0	5.25	0.24	0
Golgi (O)	EMP47	3.81	-0.83	0	4.27	-0.31	0	5.12	-1.66	2	5.02	0.11	0	3.83	0.02	0
endosom	STP22							4.82	-1.65	2						
Transkriptions- aktivatoren (F)	GLN3	4.25	-1.01	0	4.12	-0.34	0	4.28	-1.64	0				3.69	-2.41	2
Importin	SXM1				4.09	-0.62	0	4.54	-1.61	2	4.76	-0.48	0	3.74	-0.52	0
Zytoplasma (O)	HIS1	5.00	-0.59	0	5.31	-0.07	0	4.86	-1.58	2	5.53	0.11	0	4.78	-0.07	0
	SA185							3.65	-1.57	2	3.61	-0.41	0	3.48	-0.66	0
Golgi (O)	AP1B1	3.97	-0.32	0	4.16	0.21	0	4.85	-1.56	2	4.42	-0.67	0	4.31	0.14	0
Chromatin Remodeling (F)	RCO1							3.56	-1.54	2						
Zytoplasma (O)	PANE	4.38	-1.62	0	4.45	-0.14	0	4.21	-1.53	2	5.20	-0.31	0	4.40	0.02	0
	GIS4				3.70	0.01	0	3.96	-1.52	2						
	ARO1	4.91	-0.59	0	4.94	-0.39	0	4.85	-1.52	2	5.37	-0.17	0	4.98	0.01	0
mRNA Prozessierung (F)	NAB6	3.56	-1.02	0	4.01	0.05	0	4.22	-1.52	2	3.78	-0.58	0	3.99	-0.67	0
Mitochondrial	TOM70	4.53	-0.67	0	4.42	0.33	0	3.98	-1.51	2	4.71	0.08	0	4.20	0.34	0
	EMC4	3.76	-2.96	2	4.92	-0.11	0	4.66	-1.51	0	4.95	-0.05	0			
Zytoplasma (O)	MNN11	3.92	-1.21	0	3.69	0.41	0	4.69	-1.51	2	4.86	-0.01	0	4.03	-0.65	0
	RGD1							4.67	-1.51	2						
Zytoplasma (O)	PYRE				4.73	-0.45	0	4.49	-1.48	2	5.08	0.03	0	4.73	-0.15	0
T-complex	TCPG	5.13	-0.06	0	5.60	-0.20	0	5.64	-1.47	2	5.56	-0.29	0	5.27	0.10	0
	PTA1	4.11	-0.68	0	4.11	-0.59	0	4.61	-1.45	2	3.85	-0.36	0	4.01	-0.65	0
Golgi (O)	AP3M	4.50	0.04	0	4.72	-0.18	0	4.86	-1.45	2	4.49	-0.41	0	4.38	-0.02	0
Golgi (O)	AP3D							4.15	-1.44	2	3.92	0.17	0	3.71	-0.27	0
T-complex	TCPA	5.32	0.05	0	5.60	-0.33	0	5.95	-1.42	2	5.67	-0.41	0	5.10	0.23	0
Kontrolle der Zellteilung (F)	CDC50	4.48	-1.57	2				4.14	-1.41	0	4.19	-0.54	0			
Mitochondrial	LONM				4.09	-0.36	0	4.20	-1.40	2	3.71	0.09	0	4.55	0.25	0
Kontrolle der Zellteilung (F)	CDC53	3.60	-1.42	0				3.90	-1.39	2	3.93	-0.23	0	3.26	-0.33	0
	CEX1	3.15	-0.37	0				3.59	-1.38	2				3.88	0.17	0
	UBA2				3.94	-0.04	0	3.81	-1.38	2	4.26	-0.99	0	3.74	0.24	0
Golgi (O)	SEC16	5.49	-0.02	0	5.68	-0.30	0	6.00	-1.37	2	4.95	0.12	0	4.49	-0.06	0
Zytoplasma (O)	DHOM	5.25	-0.43	0	5.82	-0.32	0	5.67	-1.37	2	5.79	-0.07	0	5.42	-0.15	0
Zytoplasma (O)	PUR6	5.16	-0.23	0	5.44	-0.44	0	5.31	-1.36	2	5.30	-0.11	0	5.18	0.23	0
Golgi (O)	AP1G1	3.75	-0.54	0	4.23	0.06	0	4.63	-1.36	2	3.99	-0.59	0	3.90	0.28	0
Zytoplasma (O)	HXKB	4.81	-0.72	0	5.34	-0.48	0	5.57	-1.35	2	5.83	-0.19	0	5.57	-0.10	0
	PHB1				4.42	0.11	0	3.72	-1.35	2	4.89	0.22	0	4.15	-0.76	0

	WHI4	4.38	-0.95	0	4.45	-0.14	0	5.12	-1.32	1	4.42	-0.98	1	4.22	0.07	0
Pol I (C)	RPA49	6.07	-0.66	0	6.54	-0.17	0	6.61	-1.30	2	6.33	0.33	0	5.76	0.89	0
Zytoplasma (O)	AATC	4.91	0.11	0	5.09	-0.23	0	4.87	-1.29	2	5.35	-0.09	0	5.24	-0.06	0
Chromatin Remodeling (F)	HPC2	4.20	-3.48	2	4.02	0.10	0	4.36	-1.27	0						
T-complex	TCPD	5.61	0.19	0	5.86	0.02	0	5.87	-1.26	2	5.51	-0.22	0	5.62	0.30	0
Zytoplasma (O)	TAL1	4.88	-0.82	0	5.49	-0.44	0	5.46	-1.26	2	4.97	-0.31	0	5.18	-0.27	0
Replikation	RFC5	4.10	-1.67	2				4.53	-1.26	0				3.83	-0.11	0
Golgi (O)	VPS13	3.59	-0.61	0	3.65	0.00	0	3.66	-1.25	2	3.49	0.03	0	3.29	-0.60	0
T-complex	TCPZ	5.16	0.20	0	5.80	-0.48	0	5.76	-1.24	2	5.28	-0.58	0	5.16	0.39	0
Mitochondrial	TIM44	4.32	-0.60	0	4.32	0.25	0	4.36	-1.24	2	5.01	0.16	0			
	UBP3	4.56	-1.26	2	4.53	-0.40	0	4.75	-1.24	0	3.86	-0.49	0	3.93	-0.40	0
	CISY2	4.34	-0.13	0	4.98	-0.05	0	5.21	-1.24	1	5.31	-0.91	1	4.28	0.12	0
Golgi (O)	SLY1	4.09	-0.72	0	3.97	0.30	0	4.49	-1.22	2	4.36	-0.21	0	3.94	-0.65	0
Zytoplasma (O)	MET10	5.08	-0.42	0	5.32	-0.30	0	5.42	-1.21	2	5.44	0.08	0	5.25	0.17	0
mRNA Prozessierung (F)	DBP5	4.78	0.40	0	5.40	-0.19	0	5.46	-1.19	2	5.03	-0.17	0	5.19	-0.01	0
mRNA Prozessierung (F)	PRP19	4.38	-0.84	0	4.03	-0.29	0	4.79	-1.19	2	4.78	-0.19	0	4.18	0.16	0
Importin	IMB4	5.38	-0.44	0	5.56	-0.26	0	5.95	-1.18	2	5.61	-0.13	0	5.16	-0.31	0
	VID27	3.81	0.04	0	4.20	-0.28	0	4.54	-1.18	2	4.39	-0.43	0	4.26	0.65	0
Zytoplasma (O)	MET3	5.09	-0.53	0	5.50	-0.29	0	5.44	-1.18	2	5.56	-0.01	0	5.19	0.13	0
	FET3	4.81	-1.15	2				5.03	-1.13	0	5.09	-0.34	0			
S/T Proteinkinasen (F)	YPK1	4.78	0.24	0	5.02	0.03	0	5.75	-1.12	2	4.94	0.08	0	4.73	0.08	0
	EI2BD	3.92	-0.65	0	4.76	-0.48	0	4.56	-1.12	2	4.17	-0.17	0	4.09	0.12	0
Mitochondrial	CISY1	5.28	0.16	0	5.93	-0.60	0	6.07	-1.07	2	5.89	-0.24	0	5.45	0.10	0
Replikation	MCM2				3.89	-0.24	0	4.06	-1.07	2	3.65	-0.10	0			
Zytoplasma (O)	6PGD1	5.79	-0.13	0	6.03	-0.42	0	6.06	-1.05	2	6.17	0.06	0	5.91	0.05	0
Zytoplasma (O)	YCP4	4.74	-1.33	2	5.21	0.02	0	4.70	-1.05	0	5.32	-0.05	0	4.55	-1.07	0
	SWD2	3.74	-1.13	2				4.11	-1.04	0						
Zytoplasma (O)	ERG27	4.15	-1.76	2	4.44	-0.16	0	3.51	-1.04	0	4.57	0.07	0			
Zytoplasma (O)	LCF4	4.63	-0.40	0	4.76	0.25	0	4.52	-1.03	2	4.95	-0.10	0	4.39	0.26	0
	YJR1	4.18	-1.07	2				4.38	-1.03	0	4.92	0.20	0			
	GBLP	6.17	-1.05	1	6.61	-0.49	0	6.35	-1.02	1	6.45	0.03	0	6.00	-0.15	0
Replikation	SMC3				3.91	-0.38	0	4.37	-1.00	2	3.75	-0.38	0	3.84	0.02	0
Zytoplasma (O)	PMT1	4.41	-3.29	2	4.79	2.37	-2	4.57	-0.99	0	5.17	0.10	0	4.06	-1.94	2
Ribosomen Biogenese	ROK1	4.74	-0.74	0	4.04	0.10	0	4.34	-0.98	2	4.54	0.07	0	4.50	-0.01	0
	YP148	4.67	0.49	0	4.92	-0.62	0	4.74	-0.97	2	4.88	-0.47	0	3.76	-0.66	0
Cap binding Komplex	NCBP2	4.58	0.08	0	5.06	-0.21	0	5.24	-0.94	1	4.73	-0.89	1	4.88	0.37	0
Zytoplasma (O)	FLC2	4.06	-1.42	2				4.31	-0.91	0	3.94	0.52	0			
Zytoplasma (O)	ATC1	4.57	-1.48	2	4.41	0.43	0	5.12	-0.91	0	4.92	0.10	0			
60S (C)	RL19A	6.67	-1.26	2	7.18	-0.58	0	7.06	-0.91	0	6.86	0.08	0	6.45	0.16	0

	SDA1	3.79	-1.36	2	3.80	-0.14	0	4.38	-0.90	0	4.32	-0.41	0	3.75	0.11	0
Elongation (F)	LHP1	4.30	-2.25	2	4.56	-0.50	0	4.76	-0.90	0						
small subunit processome	UTP15	4.63	-2.01	2	4.89	-0.19	0	4.81	-0.88	0	4.69	-0.15	0	4.45	0.14	0
Zytoplasma (O)	DPP1	5.37	-1.13	2	4.98	0.43	0	4.90	-0.88	0	4.93	-0.22	0			
	RHO1	4.19	-1.27	2	5.10	0.04	0	5.36	-0.87	0	5.37	0.23	0			
small subunit processome	KRR1	4.85	-1.73	2	4.84	-0.24	0	5.38	-0.84	1				4.65	1.26	-1
Translation	IF2P	4.80	-1.96	2	5.29	-0.61	0	5.45	-0.84	0	4.82	-0.25	0	4.66	-0.76	0
TFIIIC (C)	TFC7	4.13	-1.17	2	3.88	-0.13	0	4.44	-0.83	0						
	TRS31	4.61	-1.13	2	4.99	0.35	0	4.93	-0.82	0	4.83	-0.47	0	4.08	-0.15	0
Ribosomen Biogenese	NSA1	3.47	-1.90	2				3.96	-0.81	0				4.16	0.29	0
Zytoskelle	MLC1	5.57	-1.30	2	5.89	0.13	0	6.37	-0.81	0	4.88	-0.41	0	4.67	0.16	0
nuclear cap binding complex	NCBP1	3.82	-1.09	2	4.26	-0.58	0	4.71	-0.80	0	4.51	-0.45	0	3.57	-0.61	0
	BET3	4.90	-0.96	2	4.84	0.45	0	4.95	-0.79	0	4.84	-0.42	0	4.32	0.03	0
small subunit processome	UTP17	4.19	-1.65	2	4.81	-0.28	0	5.22	-0.79	0	4.90	-0.04	0	4.10	-0.30	0
small subunit processome	UTP9	4.47	-1.89	2	4.67	0.01	0	4.80	-0.79	0	4.45	-0.05	0	4.08	-0.28	0
Ribosomen Biogenese	KRI1	5.29	-1.42	2	5.27	-0.31	0	5.37	-0.78	0	4.31	-0.05	0	4.46	1.03	0
	RBD2	4.27	-1.17	2				4.49	-0.78	0	5.37	-0.33	0			
Ribosomen Biogenese	ERB1	4.51	-1.48	2	4.91	0.13	0	5.55	-0.78	0	5.21	0.18	0	4.76	0.05	0
60S (C)	RL2A	6.45	-1.41	2	7.03	-0.44	0	7.26	-0.78	0	6.63	-0.26	0	6.03	-0.01	0
Ribosomen Biogenese	YTM1	4.64	-1.17	2	4.89	-0.13	0	5.16	-0.75	0	4.61	-0.15	0	4.68	0.15	0
Ribosomen Biogenese	RLP7	4.93	-1.24	2	5.19	-0.18	0	5.48	-0.75	0	4.76	0.16	0	5.14	0.46	0
mRNA Prozessierung (F)	LSM7	4.36	-1.56	2				4.63	-0.74	0						
small subunit processome	UTP5	4.34	-1.94	2	4.23	0.01	0	4.65	-0.74	0	4.60	0.12	0	3.97	-0.20	0
Ribosomen Biogenese	EFG1P	4.23	-2.43	2	4.93	-0.18	0	4.83	-0.72	0	4.62	0.00	0			
small subunit processome	UTP4	4.34	-2.12	2	4.33	-0.27	0	4.86	-0.72	0	4.67	0.02	0	4.13	0.12	0
small subunit processome	UTP13	4.15	-0.95	2	4.42	0.31	0	4.89	-0.67	0	4.55	-0.12	0	4.16	0.09	0
Ribosomen Biogenese	NOP9	3.27	-1.17	2	3.61	0.16	0	4.01	-0.67	0	4.08	0.09	0			
Zytoplasma (O)	KRE2	5.61	-1.61	2	4.95	0.30	0	4.69	-0.65	0	5.33	-0.14	0			
small subunit processome	UTP12	3.30	-2.56	2	4.09	-0.20	0	4.43	-0.65	0	4.36	0.09	0	3.47	0.19	0
Zytoplasma (O)	HRR25	3.75	-2.17	2	3.76	-0.03	0	4.46	-0.64	0						
small subunit processome	NOL10	4.25	-2.33	2	4.47	-0.11	0	4.16	-0.63	0	4.50	0.00	0	4.42	0.23	0
	ACA2	4.26	-1.00	1				4.44	-0.63	0	4.25	-0.39	0	4.21	-1.10	1
Zytoplasma (O)	KTR1	4.39	-1.54	2	4.20	0.13	0	4.69	-0.62	0	4.65	0.10	0	3.89	0.02	0

	AIM6	4.17	-1.44	2				4.69	-0.61	0	4.80	-0.42	0			
Golgi (O)	MNNS5	4.25	-1.91	2	4.11	0.33	0	4.33	-0.60	0	4.68	0.10	0			
small subunit processome	UTP21	3.41	-1.30	2	4.18	-0.21	0	4.35	-0.60	0	4.19	0.20	0	3.45	-0.02	0
	YCQ6	3.88	-1.95	2	4.19	0.23	0	4.56	-0.59	0	3.66	-0.11	0			
Zytoplasma (O)	KTR4	5.02	-1.57	2	4.45	-0.13	0	4.49	-0.59	0	4.71	-0.27	0			
	SNC2	6.11	-1.39	2	5.95	-0.11	0	6.05	-0.59	0	6.10	-0.41	0			
	RRP6	3.73	-1.34	2	4.07	-0.26	0	4.15	-0.58	0	3.96	-0.44	0	3.93	0.43	0
	PTM1	5.04	-1.32	2				4.89	-0.57	0	5.02	-0.47	0			
small subunit processome	LCP5	4.01	-1.77	2	4.42	0.05	0	5.03	-0.56	0	3.88	-0.08	0	3.97	0.23	0
mRNA Prozessierung (F)	NAB2	3.56	-1.89	2	4.06	-0.66	0	4.48	-0.56	0	3.97	-0.45	0			
Ribosomen Biogenese	NOP6	4.69	-1.67	2	4.97	-0.29	0	5.01	-0.55	0	4.78	0.02	0			
	RRP44	4.00	-1.35	2	3.87	-0.02	0	4.08	-0.54	0						
Mitochondrial	QCR2	4.47	-1.31	2	4.74	0.08	0	5.29	-0.51	0	4.58	0.31	0	4.50	0.10	0
Zytoplasma (O)	GDA1	4.91	-1.52	2	4.38	0.19	0	4.17	-0.51	0	5.01	-0.50	0			
Zytoplasma (O)	GAS1	5.20	-1.75	2	5.38	0.38	0	5.25	-0.49	0	5.53	-0.07	0	4.85	-1.17	0
Translation	EIF2A	3.89	-2.85	2	4.22	-0.04	0	4.02	-0.49	0	4.56	-0.10	0	4.04	-0.52	0
small subunit processome	BFR2	4.37	-1.74	2	4.09	0.00	0	4.28	-0.49	0	4.05	-0.39	0	3.88	0.01	0
Zytoplasma (O)	ATC3	4.48	-1.86	2	3.92	-0.43	0	4.21	-0.48	0	4.09	-0.46	0			
Zytoplasma (O)	AMPL	4.42	-1.01	2	4.96	0.23	0	4.79	-0.46	0	4.83	0.47	0	4.40	-0.03	0
	TMN1	4.95	-1.30	2	4.88	0.46	0	5.06	-0.44	0	5.24	-0.38	0			
TORC1/2	STM1	5.80	-1.71	2	6.24	-0.68	0	7.15	-0.41	0	5.98	-0.35	0	5.76	-0.31	0
small subunit processome	DHR1	3.97	-0.98	2	4.20	-0.56	0	4.45	-0.40	0	4.37	-0.38	0	4.13	0.03	0
60S (C)	RL5	5.54	-1.47	2	6.48	-0.36	0	6.90	-0.39	0	6.05	0.04	0	5.44	-0.52	0
Golgi (O)	DOP1	3.74	-3.93	2	3.48	-0.57	0	3.57	-0.38	0	3.70	-0.10	0	3.48	-0.53	0
Zytoskellet	TCB1	4.36	-4.27	2	3.81	-0.23	0	3.81	-0.37	0	3.93	-0.17	0			
Ribosomen Biogenese	RQC2	3.23	-2.33	2	3.82	-0.06	0	4.07	-0.37	0				4.12	-0.37	0
	LSG1	3.72	-1.50	2	3.99	0.03	0	4.99	-0.36	0	4.26	-0.38	0	3.66	-0.14	0
	KEX1	4.93	-1.34	2				5.01	-0.36	0	4.80	-0.33	0			
Elongator	ELP3	3.82	-1.12	2				4.73	-0.34	0	3.60	-0.27	0	4.25	0.22	0
Ribosomen Biogenese	REXO4	4.04	-1.81	2	4.37	0.01	0	4.70	-0.33	0						
Golgi (O)	SEC9	4.38	-0.97	0	4.26	0.14	0	5.06	-0.30	0	4.27	-0.20	0	4.06	-2.50	2
	RPN5	3.62	-1.01	0	4.77	-0.08	0	4.49	-0.28	0	5.87	-1.80	2	4.71	-0.16	0
	HSP42	3.93	-1.00	2	4.49	0.22	0	4.27	-0.28	0						
Ribosomen Biogenese	NMD3	4.10	-1.37	2	4.28	0.47	0	4.39	-0.27	0	4.52	0.13	0	4.24	-0.44	0
	GEF1	4.14	-1.25	2				3.89	-0.25	0	4.15	-0.59	0			
Ribosomen Biogenese	SRP40	5.03	-1.25	2	5.92	-0.68	0	6.20	-0.23	0	5.28	-0.15	0	5.34	-0.42	0
	ECM33	5.24	-1.15	2	5.48	-0.17	0	5.60	-0.19	0	5.90	0.09	0	5.49	-0.11	0
	YNB0							4.57	-0.18	0	4.99	-1.20	2			

Golgi (O)	SEC17	5.29	-1.34	2	5.00	0.49	0	5.04	-0.16	0	5.40	-0.19	0			
Ribosomen Biogenese	URB1	4.08	-0.90	2	4.49	0.07	0	4.90	-0.16	0	4.62	0.07	0	4.35	-0.70	0
	CIC1	5.07	-1.35	2	5.23	0.09	0	5.79	-0.15	0	4.99	0.32	0	5.12	0.13	0
	TMN2	4.67	-1.45	2	4.46	0.49	0	4.54	-0.14	0	4.79	-0.46	0			
	MRD1	4.27	-1.59	2	4.07	0.40	0	4.59	-0.12	0	3.92	-0.14	0	3.85	-0.16	0
	PSB3	4.68	-2.20	2				5.71	-0.11	0	5.15	0.16	0	5.24	-0.99	0
	KEL1				3.72	0.13	0	4.12	-0.10	0	3.14	-0.24	0	2.88	-3.06	2
small subunit processome	UTP6	3.64	-1.26	2	3.78	-0.01	0	3.74	-0.09	0	3.77	0.00	0			
Ribosomen Biogenese	URB2	4.37	-1.05	2	4.18	-0.30	0	4.64	-0.05	0	3.88	0.02	0	3.62	-0.16	0
Mitochondrial	ARGJ	3.75	-1.37	2	4.26	-0.09	0	4.49	-0.03	0	5.05	0.23	0	4.22	-0.13	0
	BNA3	3.88	0.03	0	5.06	0.11	0	5.25	-0.03	0				4.97	-1.41	2
Zytoplasma (O)	MNN1	5.08	-1.34	2				4.77	-0.02	0	5.37	0.29	0	3.58	-0.54	0
	KIP3	3.57	-1.32	2	3.94	0.40	0	4.01	0.03	0						
	UBP10	3.65	-1.23	2	4.12	0.24	0	4.31	0.08	0	3.49	0.18	0			
Golgi (O)	TLG2	4.81	-1.29	2				4.68	0.19	0	4.50	-0.45	0			
Zytoskellet	TPM1	4.17	-4.64	2				5.72	0.21	0						
	WWM1	5.03	-1.66	2	5.83	0.41	0	6.26	0.21	0	5.11	-0.28	0	5.05	-0.46	0
Mitochondrial	PP2C7	4.14	0.35	0	4.47	0.03	0	4.25	0.21	0	4.29	-1.85	2			
	VPS45	4.46	-1.25	2				4.14	0.32	0	4.28	-0.35	0			
	RT103				4.30	-1.57	2	4.31	0.32	0						
	EFM5	4.21	-3.87	2	4.39	0.37	0	5.17	0.39	0						
Translation	EIF3J							5.59	0.55	0				4.69	-2.57	2
Mitochondrial	DLD1	5.05	-1.71	2	4.74	0.43	0	4.89	1.83	0	4.83	0.28	0			
	RAS1	3.74	-1.90	2	4.24	0.40	0									
Replikation	TOP1	4.47	-2.56	2												
Zytoplasma (O)	CAN1													3.81	-1.75	2
Mitochondrial	MRS1	3.68	-2.18	2												
60S (C)	RL401	5.04	-1.26	2	6.06	-0.43	0				5.77	-0.04	0	5.78	-0.52	0
	YRF11	3.98	-4.31	2												
	ADH4													4.07	-1.30	2
Replikation	PRI1	4.03	-1.99	2												
Zytoplasma (O)	CP51	4.57	-2.71	2	4.54	-0.06	0				5.16	-0.06	0			
Mitochondrial	PET54	3.96	-1.74	2												
	KEX2	4.39	-1.27	2												
DNA Reparatur (F)	RAD4	3.46	-4.19	2												
Zytoplasma (O)	FCY2	4.98	-1.31	2	4.86	0.57	0				4.89	-0.42	0	4.66	-1.03	0
Zytoplasma (O)	SKI3	3.13	-2.01	2							3.77	-0.36	0	3.03	0.10	0
Zytoplasma (O)	GBB	4.52	-1.65	2	4.57	0.25	0				4.63	-0.39	0			
Zytoplasma (O)	DAP2	3.74	-1.86	2							3.99	-0.32	0			
	PMA2	6.24	-1.41	2												
nucleoporin	NUP1	3.52	-3.46	2												

Zytoplasma (O)	ACO1	4.21	-2.52	2					4.85	-0.04	0			
Zytoplasma (O)	OSM1	3.43	-3.03	2					4.12	0.13	0			
Transkriptions- aktivatoren (F)	DAL81	3.72	-2.92	2										
	SEC62	3.70	-3.24	2					4.45	0.20	0			
Zytoplasma (O)	MAN1	3.16	-1.08	2										
	RPI1	4.15	-2.51	2										
Zytoplasma (O)	KC11	3.58	-1.65	2										
Zytoplasma (O)	KC12	4.05	-1.08	2	4.08	-0.31	0		4.49	0.08	0			
mRNA Prozessierung (F)	MNE1	3.46	-3.81	2										
Transkriptions- aktivatoren (F)	YAP2	3.67	-4.28	2										
Zytoplasma (O)	ERG4	3.99	-3.15	2					4.40	-0.04	0			
Zytoplasma (O)	NPP1	4.44	-1.28	2					3.77	-0.67	0			
Transposon	YC21A	4.83	-1.57	2					4.75	-0.88	0			
	ITR1	4.33	-1.50	2					4.59	-0.69	0			
Zytoplasma (O)	STX8	3.77	-1.00	2										
Mitochondrial	YMC1	4.22	-2.45	2					4.85	-0.09	0			
Zytoplasma (O)	ERG2	4.83	-3.88	2					5.74	-0.30	0			
	SP110	4.96	-3.62	2										
HIR Komplex	HIR1	3.36	-2.64	2										
	MKK2											3.48	-1.98	2
Mitochondrial	PT309	3.52	-5.01	2										
Ribosomen Biogenese	NRP1	3.86	-1.86	2								3.43	-0.34	0
	EMP24	4.96	-2.19	2					5.09	-0.29	0	4.67	-1.06	0
	SKG6	4.37	-2.11	2										
	SMC1								3.59	-0.47	0	3.20	-1.46	2
	SRPR	3.96	-2.55	2	3.64	0.16	0		4.33	-0.14	0			
Transkriptions- aktivatoren (F)	PDR3	4.04	-2.52	2										
Zytoplasma (O)	SUR1	3.78	-1.24	2										
Zytoplasma (O)	PLSC	4.02	-2.63	2					4.46	0.00	0			
TFIIIC (C)	TFC4	3.03	-2.74	2										
	SEC66	3.70	-2.68	2					4.22	-0.01	0			
	CYPD	4.09	-2.95	2										
Replikation	SGS1	3.21	-3.65	2										
	LHS1	3.96	-1.63	2										
	TPO5	4.23	-1.48	2										
	YKH7	4.17	-1.31	2								3.53	-0.33	0
	TVP38	4.25	-1.68	2										
	SKG1	4.39	-1.46	2										
Mitochondrial	RM03	3.71	-2.93	2								3.59	-1.41	0
Zytoplasma (O)	STT4	2.92	-4.23	2					3.67	-0.11	0			

Mitochondrial	TXTP	3.72	-2.57	2					4.96	-0.04	0			
Transkriptions- aktivatoren (F)	RTG3	3.85	-1.84	2										
Zytoplasma (O)	IST2	4.60	-1.93	2								4.91	0.82	0
	TRS20	4.22	-0.98	2										
Zytoplasma (O)	TSC10	3.61	-2.35	2										
	YB8B	4.27	-1.34	2										
	NCB5R	4.63	-1.33	0	4.51	-0.05	0		5.08	-0.07	0	4.30	-2.11	2
Zytoplasma (O)	MSC7	3.99	-4.58	2										
Zytoplasma (O)	GPI16	3.82	-3.24	2					4.24	0.06	0			
SWI/SNF	SNF11	4.75	-6.39	2										
	TVP23	4.94	-1.15	2										
Zytoplasma (O)	STT3	3.41	-3.23	2										
Zytoplasma (O)	AKR1	4.31	-1.30	2					4.14	-0.65	0			
Zytoplasma (O)	YCF1	3.12	-2.63	2										
Zytoplasma (O)	PHO90	4.38	-1.16	2					4.27	-0.10	0			
nucleoporin	PO152	3.30	-5.91	2					3.61	-0.39	0			
nucleoporin	NUP60	3.76	-1.34	2	4.46	-0.11	0		3.56	0.10	0			
SEA Komplex	NPR2	4.07	-3.44	2										
	SSO2	4.98	-1.56	2	4.91	0.24	0		4.60	-0.20	0	4.51	-1.11	0
	VAC8	4.25	-1.82	2					5.02	-0.06	0	4.03	-0.57	0
	AVT2	4.05	-1.29	2										
	YEQ7	3.02	-4.15	2										
Golgi (O)	GET2	4.76	-2.95	2					5.29	0.13	0			
nucleoporin	NU157	2.82	-4.53	2										
Mitochondrial	RRG9	3.69	-2.26	2										
Mitochondrial	NDH1	3.75	-2.67	2	3.84	0.29	0		4.76	0.36	0	3.81	0.86	0
Zytoplasma (O)	ELO3	4.71	-3.06	2										
	VTH1	3.65	-1.45	2					4.12	-0.49	0			
Zytoplasma (O)	AYR1	4.06	-1.84	2	4.31	-0.40	0		4.10	0.12	0			
Zytoplasma (O)	ATC7	4.78	-1.37	2					3.88	-0.49	0			
Zytoplasma (O)	TED1	3.91	-2.38	2										
Zytoplasma (O)	LCB2	4.49	-2.83	2					4.86	0.29	0			
TORC1/2	LST8	3.77	-2.05	2								3.52	-0.18	0
	YRB1				5.24	0.03	0		5.28	0.17	0	4.40	-1.77	2
	FET5	4.35	-1.23	2					4.67	-0.25	0			
	YFI6	2.85	-1.88	2										
	YPP1	3.57	-2.97	2										
Zytoplasma (O)	PMT4	3.87	-3.13	2										
	VTC4	3.68	-1.42	2	4.15	0.69	0		4.50	-0.23	0	3.67	-0.21	0
	CSN12	3.21	-1.95	2										
	BIR1	2.99	-2.56	2										
mRNA Prozessierung (F)	UPF3	3.68	-2.45	2										

Zytoplasma (O)	OST3	4.05	-3.72	2											
nucleoporin	NU145	3.96	-2.09	2	4.28	0.45	0			3.76	-0.30	0	3.16	0.44	0
Replikation	CTF18	3.43	-2.21	2											
	PHB2	4.04	-1.79	2	4.45	-0.43	0			4.66	0.36	0			
	ROM2	3.03	-2.31	2									3.94	-0.30	0
Mitochondrial	RL4P	3.78	-1.74	2											
nucleoporin	NUP84	2.97	-2.01	2											
Zytoplasma (O)	CWH41	3.48	-2.07	2						4.02	0.00	0			
	SHE10	3.73	-2.77	2											
	AIM14	4.37	-1.33	2						4.12	-0.71	0			
	YGO0	3.31	-4.61	2											
Mitochondrial	RMD9	3.80	-3.85	2											
Golgi (O)	GET1	5.14	-4.25	2						4.77	0.01	0			
RSC Komplex	RSC1	3.75	-3.89	2											
	RRP46	4.18	-0.14	0	4.62	-0.15	0						4.07	-2.01	2
	ERV29	4.50	-3.37	2	4.55	0.04	0			4.69	-0.20	0			
UAF	RRN9	3.39	-3.33	2											
THO/TREX complex	THO2	2.89	-3.09	2											
Ribosomen Biogenese	SQS1	3.29	-4.17	2											
Zytoplasma (O)	ALG9	3.71	-4.16	2											
TORC1/2	FAP1	4.04	-5.93	2											
Zytoplasma (O)	KTR6	3.87	-2.33	2											
nucleoporin	MLP1	2.74	-3.02	2											
nucleoporin	NU100	4.18	-1.86	2	4.29	0.88	0								
Mitochondrial	RPM2	4.13	-3.93	2											
Mitochondrial	TIM50	4.17	-1.88	2						4.88	0.05	0			
	OSTD	4.32	-2.47	2											
	UME1	3.98	-1.07	2									4.13	-0.77	0
	ERO1	3.82	-2.75	2						4.08	0.41	0			
Golgi (O)	TLG1	5.23	-1.30	2	4.75	0.09	0								
	RSN1	4.69	-1.79	2											
Zytoplasma (O)	SCS7	3.77	-3.27	2						4.63	0.29	0			
	BET5	3.83	-1.03	2											
	TR130	4.42	-1.86	2											
nucleoporin	NUP53	3.88	-2.89	2											
	YD514	3.37	-3.52	2											
TFIIH (C)	SSL1	3.60	-3.70	2											
TORC1/2	AVO2	3.35	-3.86	2											
	TVP18	5.28	-1.39	2											
	SPC2	4.43	-3.21	2											
SWR1 Komplex	SWR1	2.97	-3.94	2											
	MSC3	3.88	-1.01	2	4.16	-0.03	0			3.71	0.17	0	4.08	0.36	0

	DUS3	3.55	-2.80	2												
	YP114	3.89	-2.67	2						4.20	0.19	0				
	PEX30	3.91	-3.44	2												
TFIIIC (C)	TFC6	3.45	-1.80	2												
Mitochondrial	RM35	3.03	-2.11	2												
	YET3	4.38	-2.11	2						4.72	0.15	0				
	TRM3									3.59	-1.86	2	3.22	0.26	0	
RSC Komplex	RSC58	3.40	-2.73	2									3.41	-0.85	0	
	YOL19	4.14	-1.76	2												
Mitochondrial	MDM38	3.69	-2.44	2						4.36	0.27	0				
Zytoplasma (O)	GAS5	4.23	-2.13	2	4.65	0.40	0			5.16	-0.31	0	4.24	-1.40	0	
TORC1/2	AVO1	2.90	-4.84	2												
	TRE1	4.26	-1.40	2												
Zytoplasma (O)	TYW1	3.47	-3.37	2												
TFIIH (C)	TFB4	3.11	-3.32	2												
	PIN2	4.47	-1.74	2												
Zytoplasma (O)	GNT1	4.08	-1.57	2												
	POM33	3.54	-3.11	2												
	HAL9	3.07	-3.50	2												
	PUS1	3.14	-2.28	2	4.20	-0.02	0			4.30	-0.43	0				
	ATG34	4.58	-4.72	2												
Zytoplasma (O)	SUL2	3.64	-1.06	2												
	ATO3									5.34	-1.47	2				
Chromatin Remodeling (F)	ARP8	3.49	-2.78	2												
	ATC8	3.54	-2.73	2												
	DFM1	3.99	-3.46	2						4.59	0.00	0				
	PGA3	3.78	-2.76	2						4.80	-0.21	0				
	SEY1	3.27	-4.21	2												
Golgi (O)	COG6						4.14	-2.01	0	4.15	-1.04	1				
Zytoplasma (O)	GDE1	3.83	0.45	0			4.15	-1.90	2	3.64	0.91	-1	4.41	0.56	0	
Mitochondrial	ATPF	4.37	-1.29	1	4.86	0.48	0	4.58	-1.63	0	5.36	0.42	0			
	SST2				4.03	-0.16	0	4.80	-1.62	1	3.93	-0.71	0			
Zytoplasma (O)	CHS3	3.79	-1.15	1	3.50	-0.05	0	3.56	-1.52	0	3.80	-0.15	0			
	DOT6	4.26	-0.52	0	4.53	1.15	-1	4.76	-1.50	2	4.56	-0.55	0	4.26	0.20	0
	YN8H				4.30	0.16	0	5.01	-1.50	1	4.33	-0.62	0			
	PUF4	4.34	-0.07	0	4.62	0.27	0	4.89	-1.43	1	5.21	-0.36	0	4.28	0.25	0
	RV167	4.86	0.34	0	5.34	-0.53	0	5.34	-1.38	1	5.02	-0.11	0	5.09	-0.11	0
	MKT1	4.48	-0.77	0	4.42	0.26	0	5.00	-1.37	1	4.83	-0.04	0	4.66	0.48	0
	AP3B	3.88	-0.19	0	3.63	-0.15	0	3.76	-1.32	1	4.10	-0.30	0	3.92	-0.39	0
	AP2M						3.32	-1.32	1				3.28	0.46	0	
CCR4-NOT (C)	NOT4	4.31	-0.35	0	4.91	-0.38	0	5.01	-1.31	1	4.38	-0.62	0	4.20	-0.07	0
RSC Komplex	SFH1						4.15	-1.31	1							
	ERG26	4.84	-0.28	0	5.03	-0.01	0	5.14	-1.30	1	4.84	0.17	0	4.47	0.61	0

	PUR8	4.86	-0.52	0	5.40	-0.36	0	5.13	-1.28	1	5.53	-0.21	0	5.47	-0.11	0
Translation	EI2BE	4.16	-0.79	0	4.39	-0.46	0	4.81	-1.22	1	4.46	-0.39	0	4.61	-0.06	0
	SMY2	5.10	0.91	0	5.30	-0.03	0	4.90	-1.21	1	4.79	-0.73	0	4.35	0.16	0
Importin	CSE1							3.74	-1.21	1	4.33	-0.04	0			
	GID8							3.72	-1.11	1				3.65	1.10	0
	PBP1	5.46	0.05	0	5.16	-0.29	0	5.40	-1.07	1	5.09	0.02	0	5.29	0.62	0
	SHE3							4.30	-1.06	1						
CCR4-NOT (C)	CCR4	4.26	0.32	0	4.34	-0.02	0	5.22	-1.04	1	4.68	-0.67	0	4.09	-0.10	0
CCR4-NOT (C)	NOT3	4.30	0.20	0	5.04	-0.43	0	4.97	-1.03	1	4.72	-0.38	0	4.39	0.00	0
S/T Proteinkinasen (F)	YPK2	3.94	0.26	0	4.42	-0.12	0	4.91	-1.02	1	4.51	0.04	0	4.51	0.12	0
Pol I (C)	RPA34	5.93	-0.61	0	6.32	-0.02	0	6.38	-1.02	1	5.77	0.21	0	5.50	0.85	0
	PRA1	5.53	-0.54	0	6.07	-0.11	0	6.17	-1.00	1	5.65	0.14	0	5.23	0.09	0
	SRO9	6.12	-0.39	0	5.40	-0.46	0	5.44	-1.00	1	4.88	-0.54	0	5.96	0.26	0
	ASSY	5.48	-0.21	0	5.82	-0.39	0	5.76	-0.99	1	5.81	0.17	0	5.39	-0.36	0
	ELP1	4.07	-0.83	0	4.03	-0.18	0	4.63	-0.99	1	4.64	-0.41	0	4.11	0.21	0
	EF2	6.56	-0.20	0	6.58	-0.52	1	6.65	-0.98	0	6.82	0.09	0	6.38	0.05	0
	HIS5	4.18	-0.52	0	4.14	-0.27	0	4.19	-0.98	1	4.63	0.09	0	4.45	-0.07	0
	COPG	4.76	-0.65	0	5.26	-0.13	0	5.83	-0.98	1	6.52	0.02	0	4.68	-0.06	0
	DHH1	5.21	-0.01	0	5.77	-0.15	0	5.28	-0.94	1	5.62	0.11	0	5.46	-0.13	0
	C1TC	5.50	-0.50	0	5.91	-0.19	0	5.85	-0.91	1	6.10	-0.20	0	5.40	-0.17	0
	PSA2	5.26	0.41	0	5.91	-0.12	0	5.88	-0.91	1	5.31	-0.28	0	5.41	0.37	0
	SSD1	4.67	-1.00	0	4.22	-0.14	0	5.46	-0.91	0	4.31	-0.58	1	4.50	0.11	0
Ribosomen Biogenese	GAR1	5.74	-1.01	1	6.00	-0.34	0	6.38	-0.88	0	5.93	0.17	0	5.84	0.14	0
	NSR1	5.46	-1.27	2	5.91	-0.02	0	6.67	-0.87	0	5.81	0.98	-1	5.74	0.07	0
	YPT7	5.14	-0.51	0	5.32	0.11	0	5.58	-0.86	1	5.74	-0.08	0	5.02	0.31	0
Zytoplasma (O)	GLNA	5.77	-0.90	1	6.20	-0.30	0	6.16	-0.85	0	6.11	-0.17	0	5.73	-0.17	0
Translation	EI2BG	3.95	-0.63	0	4.39	-0.20	0	4.59	-0.84	0	4.83	-0.65	1	4.45	-0.14	0
	LSM5	4.84	-1.33	1	5.13	-0.17	0	5.64	-0.78	0	5.05	-0.58	0			
mRNA Prozessierung (F)	DCP1	4.45	-1.19	1	4.51	0.10	0	5.05	-0.74	0	4.47	-0.40	0			
Chromatin Remodeling (F)	RPD3	4.74	-0.69	0	4.72	-0.48	0	4.65	-0.71	0	4.57	-0.65	1	4.96	0.41	0
	COPE				4.76	-0.40	0	4.97	-0.70	0	5.03	-0.53	1			
Zytoplasma (O)	GAP1	5.65	-1.11	1	5.82	-0.32	0	5.94	-0.65	0	6.24	0.35	0	5.12	-0.76	0
	LSM6	4.96	-1.12	1	5.38	0.01	0	5.83	-0.56	0						
	DLD3	5.25	-0.04	0	5.79	-0.29	0	5.59	-0.48	0	5.86	-0.52	1	5.45	-0.08	0
	STV1	4.92	-1.08	1	4.82	0.44	0	4.91	-0.45	0	4.90	-0.13	0			
	SMI1	5.85	-1.10	1	5.16	-0.76	0	5.63	-0.39	0	5.58	-0.31	0			
40 S (C)	RS11A	7.04	-0.94	1	7.09	-0.47	0	7.13	-0.34	0	6.85	-0.07	0	6.74	0.34	0
	RL6A	7.00	-0.77	0	7.35	-0.57	1	7.30	-0.32	0	7.09	-0.19	0	6.70	0.15	0
Transkriptions- aktivatoren (F)	RAP1	3.90	-1.03	0	4.29	0.28	0	5.15	-0.31	0	4.49	-0.43	0	3.70	-0.99	1
	RL6B	6.91	-0.80	0	7.30	-0.57	1	7.25	-0.30	0	7.05	-0.21	0	6.61	0.09	0

Ribosomen Biogenese	RRP8	4.53	-0.90	1	4.15	0.37	0	4.50	-0.26	0	4.68	-0.17	0	3.84	0.01	0
	DBP6	4.44	-0.87	1	4.60	-0.37	0	5.36	-0.26	0	5.21	-0.30	0	4.41	-0.06	0
Zytoplasma (O)	SUCB	4.45	-0.57	0	4.39	-0.73	1	4.11	-0.14	0	4.94	0.07	0	4.52	0.11	0
Mitochondrial	ALDH5	5.14	-1.04	1	5.41	0.32	0	5.40	-0.06	0	5.16	-0.11	0	5.05	0.10	0
	GCH1				4.81	-0.13	0	5.48	0.12	0	5.01	-0.55	1			
Mitochondrial	COX5A	4.70	-1.71	2							5.10	0.56	-1			
	TRS65	4.15	-1.01	1												
	SMF2	4.69	-1.14	1												
	IPT1	4.33	-1.18	1												
	YG4I										3.92	-0.81	1			
	YJ12A				6.59	-0.85	1									
	AP18B										4.31	-0.93	1	4.25	0.02	0
	YN8S	4.35	-1.07	1												
Chromatin Remodeling (F)	HOS3				3.41	-1.24	1									
Ribosomen Biogenese	NOP53	4.38	-0.89	1										4.09	0.33	0
Replikation	CDT1				5.17	1.79	-2	3.91	-2.34	2				4.28	2.12	-2
	BNI1							3.46	-1.88	2				4.21	3.08	-2
Replikation	MRC1	4.14	2.39	-2	4.07	-0.50	0	4.03	-1.79	2	4.00	-0.57	0	4.15	0.23	0
	SKI2	5.52	-3.09	0	3.70	-0.37	0	3.93	-1.68	0	4.74	-0.81	2	3.74	3.96	-2
	AFG2				3.74	2.83	-2	3.58	-1.55	2	3.75	0.65	0	3.70	0.29	0
	RXT2	4.29	-0.70	0	4.74	-0.74	0	4.89	-0.98	2	4.44	2.59	-2	4.04	-0.14	0
Ribosomen Biogenese	RLP24	4.80	-1.46	2				6.03	1.42	0	5.82	3.69	-2			
	MRH1	4.98	-0.94	0							4.86	1.73	-2	5.15	-1.86	2

6.7.2 Interaktionspartner der Untereinheit Srb9 aus dem Kinasemodul

Anhang 20 Auflistung aller als signifikant ermittelten Proteine die mit der Untereinheit Srb9/Med13 co-isoliert werden konnten. Alle Werte entsprechen dem Triplikot. Die Signifikanz wird für Proteine der Kategorie I mit dem Wert 2 und für die Kategorien II und III mit dem Wert 1 angegeben.

Komplex Funktion Organell (O)	(F) (C)/ /	Gen	log ₁₀ BAQ	log ₂ (H/L)	Signifikanz
Mediator Komplex		MED8	6.68	-7.81	2
Mediator Komplex		NUT2	6.28	-7.31	2
Mediator Komplex		SRB8	5.80	-7.26	2
Mediator Komplex		SSN3	6.67	-7.04	2
Mediator Komplex		RGR1	5.82	-6.87	2
Mediator Komplex		MED6	5.48	-6.83	2
Mediator Komplex		MED4	6.26	-6.76	2
Mediator Komplex		SSN8	6.17	-6.70	2
Mediator Komplex		SSN2	6.17	-6.69	2
Mediator Komplex		MED7	6.21	-6.68	2

Mediator Komplex	SRB4	6.43	-6.65	2
Mediator Komplex	MED11	6.61	-6.63	2
Mediator Komplex	SIN4	5.58	-6.57	2
Mediator Komplex	ROX3	6.16	-6.50	2
Mediator Komplex	NUT1	5.91	-6.40	2
Mediator Komplex	GAL11	6.57	-6.34	2
Mediator Komplex	MED1	6.08	-6.26	2
Mediator Komplex	CSE2	5.67	-6.21	2
Mediator Komplex	SRB7	5.89	-6.20	2
Mediator Komplex	SRB5	5.70	-6.11	2
Mediator Komplex	MED2	6.30	-5.97	2
Mediator Komplex	PGD1	6.53	-5.72	2
Mediator Komplex	SRB2	6.25	-5.64	2
Mediator Komplex	SRB6	6.26	-5.62	2
Transkriptionsaktivator (F)	GCR1	4.36	-5.24	2
Transkriptionsaktivator (F)	GCR2	4.94	-4.56	2
SAGA Komplex	SPT3	4.14	-4.45	2
Transkriptionsaktivator (F)	PDR1	4.18	-4.16	2
Transkriptionsaktivator (F)	YAP1	5.18	-3.86	2
SAGA Komplex	TRA1	3.19	-3.52	2
SAGA Komplex	SPT20	4.14	-3.39	2
SAGA Komplex	HFI1	3.82	-3.27	2
Transkriptionsaktivator (F)	TYE7	4.41	-3.24	2
Transkriptionsaktivator (F)	HAA1	4.62	-2.93	2
SAGA Komplex	SGF73	4.31	-2.75	2
SAGA Komplex	NGG1	4.31	-2.65	2
Transkriptionsaktivator (F)	SPT7	3.93	-2.46	2
SWI/SNF	SWI1	4.12	-2.26	2
	MLF3	4.30	-2.18	2
Modifikation	SMT3	4.54	-2.15	2
	YLR108C	4.05	-1.87	2
TFIID (C)	TAF12	4.37	-1.83	2
TFIIIC (C)	TFC3	3.49	-1.83	2
SWI/SNF	SNF12	4.19	-1.83	2
SWI/SNF	SNF2	4.04	-1.81	2
SWI/SNF	SWI3	4.61	-1.78	2
HIR Komplex	HPC2	4.10	-1.75	2
TFIID (C)	TFG1	3.97	-1.73	2
SAGA Komplex	ADA2	3.95	-1.70	2
SAGA Komplex	SPT8	4.55	-1.70	2
S/T Proteinkinase (F)	RTK1	4.73	-1.69	2
TFIIIB (C)	BDP1	3.84	-1.64	2
	RTG2	4.12	-1.63	2

Translation (F)	TIF11	4.42	-1.61	2
INO80 Komplex	IES1	3.82	-1.57	2
SWI/SNF	SWP82	4.32	-1.81	1
SWI/SNF	SNF5	4.33	-1.77	1
	VIP1	4.46	-1.66	1
	HSP26	5.83	-1.62	1
INO80 Komplex	NHP10	4.71	-1.56	1
	STB1	4.11	-1.50	1
	IES5	4.25	-1.49	1
	HIR2	3.82	-1.48	1
	STI1	5.37	-1.48	1
	INO80	4.03	-1.45	1
TFIID (C)	TAF6	4.44	-1.43	1
	HIR3	2.95	-1.43	1
TFIID (C)	TAF14	4.87	-1.42	1
TBP	SPT15	4.51	-1.41	1
TFIID (C)	TAF10	4.93	-1.41	1
	SKN7	4.55	-1.40	1
TFIIIC (C)	TFC1	3.89	-1.39	1
TFIID (C)	TAF5	4.49	-1.33	1
HIR Komplex	HIR1	3.52	-1.33	1
	IES4	4.48	-1.33	1
	BRF1	4.10	-1.32	1
	GLN3	3.68	-1.28	1
	RPO21	4.81	-1.25	1
	FPK1	3.76	-1.22	1
	MOT1	3.96	-1.21	1
	MIT1	4.35	-1.19	1
	PDC2	6.89	-1.19	1
lsw1 (C)	ISW2	3.44	-1.18	1
TFIIIC (C)	TFC7	4.51	-1.17	1
	RNQ1	5.65	-1.14	1
	CBK1	4.72	-1.14	1
	MOB2	4.91	-1.08	1
	VPS1	5.64	-1.07	1
	SSA1	6.91	-1.03	1
	SRP1	4.66	-1.02	1
	MGM101	4.86	-0.92	1

6.7.3 Interaktionspartner Med17 mit Rapamycin

Anhang 21 Auflistung aller Proteine die nur nach einer 30-minütigen Behandlung der Hefezellen mit 500ng/ml Rapamycin durch eine Co-IP mittels Med17-HA als signifikante Interaktionspartner co-isoliert werden konnten oder ihre Signifikanz durch die Behandlung verloren haben und nur ohne Rapamycin als signifikant detektiert werden konnten.

Proteinbeschreibung	Med17-HA ohne Rapamycin		Med17-HA mit Rapamycin	
	log ₁₀ iBAQ	log ₂ (H/L)	log ₁₀ iBAQ	log ₂ (H/L)
mRNA transport factor GFD1	7.13	-10.33		
General control protein GCN4	4.86	-6.14		
Zinc finger protein FZF1	4.96	-4.75		
Transcription factor tau 138 kDa subunit	3.85	-4.75		
Exocyst complex component SEC15	4.66	-4.71		
Peroxisomal membrane protein import receptor PEX19	5.94	-4.49		
RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN5	3.93	-4.20		
Protein ATC1/LIC4	4.83	-3.96		
Protein RER1	5.38	-3.84		
RNA polymerase II transcription factor B subunit 1	3.80	-3.80		
Protein MSN5	3.28	-3.77		
Transcriptional regulator MET32	4.33	-3.72		
DNA topoisomerase 2	4.38	-3.70	4.41	-1.57
RNA polymerase II transcription factor B subunit 2	4.36	-3.68		
Serine-rich protein TYE7	4.79	-3.67		
Telomere length regulator protein RIF1	3.31	-3.67		
Nonsense-mediated mRNA decay protein 2	3.74	-3.60		
Serine/threonine-protein kinase KIN4	3.79	-3.58		
rRNA methyltransferase 1, mitochondrial	3.84	-3.57		
DNA repair helicase RAD25	4.23	-3.57		
DNA replication fork-blocking protein FOB1	4.42	-3.50		
U2 snRNP component HSH155	3.64	-3.50		
Transcription initiation factor TFIID subunit 8	5.07	-3.46		
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC5	7.23	-3.42	5.91	-1.76
Exocyst complex component SEC10	3.87	-3.33		
Telomere length regulation protein TEL2	3.42	-3.33		
Tricalbin-2	3.87	-3.29		
Protein IBD2	4.53	-3.29		
Mitochondrial oxaloacetate transport protein	3.98	-3.27		
Transcription factor MBP1	3.95	-3.27	4.78	-0.60
Uncharacterized protein YGR122W	4.36	-3.26	4.15	-0.73
Transcription and mRNA export factor SUS1	5.17	-3.24		
Transcription initiation factor TFIID subunit 13	4.71	-3.22		
Manganese-transporting ATPase 1	4.22	-3.20		
Transcription initiation factor IIE subunit alpha	5.32	-3.17		
Nuclear protein STH1/NPS1	4.31	-3.13	4.38	-0.71
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	3.67	-3.03		
ATP-dependent RNA helicase DBP10	4.45	-3.02	3.28	-1.83
Serine/threonine-protein kinase KSP1	4.08	-2.97		
ISWI chromatin-remodeling complex ATPase ISW2	3.68	-2.94		
Regulatory protein SIR3	3.99	-2.93		
Peroxisomal membrane protein PMP27	4.18	-2.92		
DNA repair helicase RAD3	3.99	-2.88		
Bromodomain-containing factor 2	4.22	-2.86		
Protein STU2	4.31	-2.86		
Tricalbin-3	4.95	-2.84		
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8	4.53	-2.83		
UPF0674 endoplasmic reticulum membrane protein YNR021W	4.30	-2.82		
Midasin	4.23	-2.81	3.95	-0.80

Anhang

Mitochondrial GTP/GDP carrier protein 1	3.95	-2.81		
Transposon Ty2-LR1 Gag-Pol polyprotein	4.67	-2.79		
Transposon Ty1-BL Gag-Pol polyprotein	5.53	-2.78		
Protein STU1	3.69	-2.78	3.47	-0.05
THO complex subunit HPR1	4.17	-2.77		
Tat-binding homolog 7	3.85	-2.76	3.73	-0.71
Mitochondrial escape protein 2	3.09	-2.75		
Cyclin CCL1	4.53	-2.74		
Vacuolar protein sorting-associated protein 53	3.63	-2.71		
Protein ORM1	4.30	-2.71		
Bromodomain-containing factor 1	4.95	-2.70	3.91	-0.19
Partitioning protein REP1	5.26	-2.69	4.35	-0.50
Phosphatidyl-N-methylethanolamine N-methyltransferase	4.77	-2.69		
Mitochondrial clpX-like chaperone MCX1	4.55	-2.66	4.74	-0.05
NADPH--cytochrome P450 reductase	4.74	-2.65		
Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase 2	4.23	-2.63		
Myosin-2	5.20	-2.63	4.59	-0.21
Suppressor of mar1-1 protein	3.93	-2.61		
Serine/threonine-protein kinase KIC1	4.21	-2.61		
Protein SPP41	3.72	-2.58		
Transcription factor IIIB 70 kDa subunit	3.80	-2.57		
Isoform Nuclear of DNA ligase 1	4.15	-2.57	3.39	2.21
Squalene synthase	4.11	-2.54		
Sphingosine-1-phosphate lyase	3.42	-2.53		
Protein translocation protein SEC63	4.25	-2.52		
Transcription factor SKN7	5.16	-2.52	3.92	-1.87
Protein ERP1	5.10	-2.52		
ADP,ATP carrier protein 2	5.04	-2.51	4.85	0.56
ER membrane protein complex subunit 1	4.16	-2.51		
Sec sixty-one protein homolog	4.65	-2.48		
Transposon Ty1-GR1 Gag-Pol polyprotein	6.12	-2.47		
Protein YOP1	5.52	-2.47	5.06	0.20
Cell division control protein 24	4.14	-2.46	3.80	-0.68
Endoplasmic reticulum vesicle protein 25	5.63	-2.45		
Protein FAF1	3.82	-2.44		
Phosphate system positive regulatory protein PHO81	4.31	-2.44	4.43	-0.22
Protein TBF1	4.61	-2.43		
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	4.08	-2.43		
Protein PET10	4.41	-2.42		
RNA polymerase II transcription factor B subunit 3	4.94	-2.41		
Medium-chain fatty acid ethyl ester synthase/esterase 2	4.65	-2.38		
Importin subunit beta-3	4.56	-2.36	4.67	0.08
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4	3.72	-2.33		
Dilute domain-containing protein YPR089W	4.50	-2.33	4.57	-0.54
TATA-binding protein-associated factor MOT1	3.65	-2.32	3.55	-0.49
Cell division cycle protein CDT1	3.91	-2.32		
High mobility group protein 1	6.52	-2.31	6.30	-0.56
ISWI one complex protein 2	4.20	-2.31		
C-5 sterol desaturase	4.55	-2.31		
Protein transport protein SEC61	4.90	-2.31		
mRNA 3'-end-processing protein RNA14	4.14	-2.30		
Nucleoporin NUP133	3.87	-2.28		
Probable mitochondrial transport protein FSF1	4.06	-2.27		
Protein transport protein SEC22	5.62	-2.26		
Alanine/arginine aminopeptidase	3.53	-2.26		
Phosphoinositide phosphatase SAC1	4.67	-2.26		
Putative tyrosine-protein phosphatase OCA6	4.01	-2.25	4.37	-0.17

Anhang

Glucose-signaling factor 2	4.25	-2.23	4.07	-0.36
Processing of GAS1 and ALP protein 2	4.92	-2.22		
Inorganic phosphate transport protein PHO88	5.55	-2.22	4.99	0.11
Vacuole morphology and inheritance protein 14	3.57	-2.21		
Flocculation suppression protein	4.09	-2.17		
Ribosome biogenesis ATPase RIX7	4.39	-2.16	4.24	0.73
Chromatin structure-remodeling complex protein RSC3	5.86	-2.16	5.04	-1.77
Protein SPA2	4.73	-2.13	4.50	-0.97
Protein HIR2	4.20	-2.12		
ATP-dependent rRNA helicase RRP3	4.74	-2.09	4.98	0.03
Putative inosine-5%27-monophosphate dehydrogenase 1	6.56	-2.09		
Reticulon-like protein 1	5.85	-2.08	4.86	0.35
Fe-S cluster assembly protein DRE2	4.65	-2.07		
Pre-mRNA-splicing helicase BRR2	3.52	-2.06		
General negative regulator of transcription subunit 1	4.51	-2.05	4.53	-0.59
Endoplasmic reticulum transmembrane protein 1	4.64	-2.04		
Translational activator GCN1	4.64	-2.04	4.56	-0.39
Protein JSN1	4.28	-2.02		
Allantoate permease	3.96	-2.01	4.70	-0.95
Dynamin-related protein DNM1	4.85	-2.00	4.61	-0.05
Aminopeptidase 2, mitochondrial	3.93	-1.99	4.03	-0.02
Protein transport protein SEC7	4.40	-1.99	4.29	-0.16
ER-derived vesicles protein ERV46	5.33	-1.99	4.51	-1.27
Clathrin coat assembly protein AP180A	5.06	-1.98		
V-type proton ATPase subunit D	6.38	-1.98	5.40	-0.34
Vacuolar import and degradation protein 22	4.14	-1.97		
Citrate/oxoglutarate carrier protein	4.71	-1.97	4.67	0.37
Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	4.73	-1.96	4.58	-0.46
Low-affinity glucose transporter HXT3	4.88	-1.96	4.67	-1.17
Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE1	4.15	-1.96	5.10	-0.07
Dolichol-phosphate mannosyltransferase	5.09	-1.93	4.28	0.41
Ino eighty subunit 1	3.89	-1.93		
Protein BOB1	4.20	-1.91	4.88	-0.37
DNA mismatch repair protein MSH2	3.87	-1.90	3.92	-0.38
WD repeat-containing protein JIP5	4.42	-1.90		
Suppressor of glycerol defect protein 1	3.87	-1.89		
Plasma membrane ATPase 1	6.22	-1.88	6.26	-0.39
Protein BNI1	3.46	-1.87	3.10	-0.33
Ran-specific GTPase-activating protein 30	4.04	-1.86		
Vacuolar transporter chaperone 2	4.54	-1.85	3.69	-0.77
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit WBP1	4.65	-1.85		
Transketolase 1	5.38	-1.82	5.02	-0.25
Iron-regulated transcriptional activator AFT1	4.00	-1.82		
D-arabinono-1,4-lactone oxidase	4.43	-1.80		
Squalene monooxygenase	3.81	-1.77		
Fork head protein homolog 1	4.56	-1.74		
Bud emergence protein 1	4.24	-1.70	4.16	-0.15
DNA repair protein RAD59	4.59	-1.70		
Chromatin structure-remodeling complex subunit RSC4	3.89	-1.69		
FACT complex subunit SPT16	5.01	-1.67	4.52	-0.73
Probable mannosyltransferase KTR3	4.76	-1.67	4.30	-0.76
FK506-binding protein 4	5.18	-1.67		
Essential nuclear protein 1	4.79	-1.67	5.10	-0.20
ISWI chromatin-remodeling complex ATPase ISW1	4.32	-1.67	4.23	-0.39
T-complex protein 1 subunit eta	5.71	-1.66	5.46	-0.24
Protein EMP47	5.12	-1.66		
Sterol 24-C-methyltransferase	5.45	-1.65	4.47	-0.03

Putative DNA helicase INO80	3.70	-1.65		
Suppressor protein STP22 of temperature-sensitive alpha-factor receptor and arginine permease	4.82	-1.64		
Vesicle-associated membrane protein-associated protein SCS2	5.80	-1.64	5.31	-0.03
Isoform 2 of tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase, mitochondrial	4.37	-1.63		
Chitin synthase 1	4.26	-1.61		
Nucleolar complex-associated protein 3	4.46	-1.61		
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	3.99	-1.61	4.14	-0.20
Importin beta SMX1	4.55	-1.61	3.48	-0.70
Homoserine kinase	6.42	-1.58	6.04	-0.38
E3 ubiquitin-protein ligase TOM1	3.03	-1.58		
ATP phosphoribosyltransferase	4.86	-1.58	4.77	-0.38
RHO GTPase-activating protein RGD1	4.67	-1.57	3.83	0.66
SIT4-associating protein SAP185	3.66	-1.57		
Chromatin modification-related protein EAF3	4.72	-1.56	4.00	-0.83
AP-1 complex subunit beta-1	4.85	-1.56	3.67	-0.65
Chromatin structure-remodeling complex protein RSC6	4.08	-1.54	4.11	-0.54
Transcriptional regulatory protein RCO1	3.56	-1.53		
Protein GIS4	3.96	-1.52		
Pentafunctional AROM polypeptide	4.86	-1.52	5.11	-0.44
AP-3 complex subunit sigma	5.06	-1.52	5.34	-0.01
2-dehydropantoate 2-reductase	4.21	-1.52	4.52	-0.35
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	3.98	-1.51		
Mitochondrial import receptor subunit TOM40	4.56	-1.49		
Transcriptional regulatory protein DOT6	4.75	-1.49		
Exocyst complex component EXO84	4.35	-1.49		
Vacuolar protein sorting-associated protein 1	5.86	-1.49	5.33	-0.16
Orotate phosphoribosyltransferase 1	4.49	-1.47	4.48	0.57
T-complex protein 1 subunit gamma	5.64	-1.46	5.57	-0.30
Pre-rRNA-processing protein RIX1	4.19	-1.45	3.96	-1.23
Pre-tRNA-processing protein PTA1	4.61	-1.44	3.56	-0.63
Nucleolar complex protein 14	4.85	-1.44	4.34	-0.79
AP-3 complex subunit mu	4.86	-1.44	4.63	-0.19
ATPase family gene 2 protein	3.59	-1.44		
FK506-binding nuclear protein	6.02	-1.43	5.33	-0.12
AP-3 complex subunit delta	4.15	-1.43	4.81	1.58
T-complex protein 1 subunit alpha	5.95	-1.42	5.31	-0.22
Sm-like protein LSm1	4.68	-1.40		
Histone H2B.2	7.00	-1.40		
Lon protease homolog, mitochondrial	4.20	-1.39	3.97	0.39
Cell division control protein 53	3.91	-1.38		
Cytoplasmic export protein 1	3.59	-1.38	3.73	-0.45
DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	3.48	-1.37		
Ubiquitin-activating enzyme E1-like	3.81	-1.37		
Homoserine dehydrogenase	5.67	-1.35	5.53	-0.21
AP-1 complex subunit gamma-1	4.63	-1.35	4.74	-0.71
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	5.31	-1.35	5.36	-0.22
Prohibitin-1	3.73	-1.34		
ATP-dependent RNA helicase DRS1	4.03	-1.34		
FACT complex subunit POB3	4.70	-1.33	4.23	-0.57
Hexokinase-2	5.57	-1.33	5.60	0.14
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial	6.70	-1.33	5.85	0.19
60S ribosomal protein L15-B	6.80	-1.31		
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	5.81	-1.31		
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	6.61	-1.29	6.65	-0.95
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	4.86	-1.27	5.26	0.03

Anhang

Alpha-1,2-mannosyltransferase MNN2	4.28	-1.27		
T-complex protein 1 subunit delta	5.87	-1.26	5.49	-0.21
Transaldolase	5.46	-1.25	5.36	-0.15
Transcription factor tau 95 kDa subunit	4.04	-1.25	3.66	0.25
Vacuolar protein sorting-associated protein 13	3.65	-1.24	3.58	-0.27
Diphthamide biosynthesis protein 2	4.88	-1.23		
T-complex protein 1 subunit zeta	5.76	-1.23	5.26	-0.13
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	4.36	-1.23		
Protein SLY1	4.49	-1.21		
Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein component	5.42	-1.20	5.50	-0.09
Nucleolar GTP-binding protein 1	5.46	-1.20	4.50	-0.78
Chromatin structure-remodeling complex subunit RSC7	4.71	-1.19	4.63	-0.68
ATP-dependent RNA helicase DBP5	5.46	-1.18	5.51	0.33
Importin subunit beta-4	5.95	-1.17	5.68	0.04
Vacuolar import and degradation protein 27	4.54	-1.17		
Serine/threonine-protein kinase YPK1	5.74	-1.12	5.19	-0.28
Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	4.57	-1.11	4.23	-0.05
Protein transport protein SFT2	4.96	-1.10		
Transcriptional regulatory protein SIN3	4.30	-1.09	4.16	-0.64
Citrate synthase, mitochondrial	6.07	-1.06	5.85	0.15
DNA replication licensing factor MCM2	4.07	-1.06		
Ras-like protein 2	4.47	-1.06		
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	4.52	-1.03	4.24	-0.24
Endoribonuclease YSH1	4.23	-1.02		
Structural maintenance of chromosomes protein 3	4.37	-0.99		
Transcriptional regulatory protein RXT2	4.89	-0.97		
Uncharacterized protein YPR148C	4.74	-0.95		
RNA-binding protein MRN1	4.60	-0.93		
	Med17-HA ohne Rapamycin		Med17-HA mit Rapamycin	
Proteinbeschreibung	log₁₀iBAQ	log₂(H/L)	log₁₀iBAQ	log₂(H/L)
Autophagy-related protein 34			4.21	-5.42
Y%27 element ATP-dependent helicase protein 1 copy 1			3.51	-5.14
Cytochrome B pre-mRNA-processing protein 1			3.36	-4.99
ATP-dependent helicase SGS1			3.53	-4.81
Protein HUA2			4.09	-4.72
Pentatricopeptide repeat-containing protein PET309, mitochondrial			3.45	-4.66
Anaphase-promoting complex subunit 1			2.59	-4.63
FKBP12-associated protein 1			3.82	-4.53
Uncharacterized protein YIL161W			4.37	-4.50
Maintenance of telomere capping protein 5			3.06	-4.43
Regulatory protein CAT8			3.51	-4.25
Protein THP3			3.46	-4.23
DNA topoisomerase 3			2.98	-4.10
Ribonuclease P protein component, mitochondrial			3.69	-4.06
Morphogenesis-related protein MSB1			3.72	-4.03
Metallothionein expression activator	3.72	-2.37	3.61	-4.00
Nitrogen permease regulator 3			3.28	-3.96
Cop9 signalosome complex subunit 12			3.82	-3.94
Protein SOV1, mitochondrial			3.19	-3.70
Replication factor A protein 1	4.77	-0.31	3.34	-3.53
Ribosomal RNA-processing protein 14			3.87	-3.45
U3 small nucleolar RNA-associated protein 12	4.43	-0.64	3.85	-3.43
U3 small nucleolar RNA-associated protein 9	4.80	-0.78	4.29	-3.40
Serine/threonine-protein kinase BCK1/SLK1/SSP31			3.26	-3.36
Nucleoporin NUP170			3.13	-3.36
Regulator of ribosome biosynthesis	5.69	-0.65	5.27	-3.30
Kelch repeat-containing protein 1	4.12	-0.09	4.54	-3.28

Anhang

Phosphatidylinositol 4-kinase STT4			3.34	-3.26
Vacuolar membrane-associated protein IML1			4.37	-3.25
Protein MLP1			3.51	-3.21
BTB/POZ domain-containing protein YLR108C			3.74	-3.19
Protein transport protein SEC9	5.07	-0.29	4.59	-3.16
Protein RMD9, mitochondrial			4.16	-3.14
Antiviral helicase SLH1			3.04	-3.09
Nitrogen permease regulator 2			3.89	-3.08
Uncharacterized RNA-binding protein YGR250C	3.54	-0.26	3.71	-3.07
Protein PET54			3.78	-3.04
Kelch repeat-containing protein 2			3.19	-2.99
60S acidic ribosomal protein P2-beta	6.73	-0.40	5.15	-2.97
Uncharacterized protein YMR295C	6.48	-0.31	6.43	-2.95
Putative mitochondrial translation system component PET127			4.26	-2.84
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3	4.75	-1.23	5.03	-2.76
Serine/threonine-protein kinase TOR1			3.16	-2.68
Nucleoporin POM152			3.20	-2.66
Nucleoporin NUP188			3.23	-2.63
1,3-beta-glucan synthase component FKS1	5.93	-0.93	6.24	-2.56
5%27-3%27 exoribonuclease 2	4.23	-1.18	4.30	-2.48
U3 small nucleolar RNA-associated protein 4	4.87	-0.71	4.45	-2.47
NET1-associated nuclear protein 1	5.22	-0.78	4.72	-2.39
Membrane protein PTM1	4.90	-0.56	4.60	-2.38
Serine/threonine-protein kinase AKL1	4.25	-0.38	5.87	-2.37
Alkylphosphocholine resistance protein LEM3	4.35	-1.08	4.25	-2.36
Phospholipid-transporting ATPase DNF1	4.42	-1.28	4.51	-2.33
THO complex subunit 2			3.24	-2.29
Pre-mRNA-splicing factor 8			2.95	-2.28
54S ribosomal protein L3, mitochondrial			4.06	-2.25
Nucleoporin NSP1	6.10	-0.73	4.95	-2.23
Transposon Ty1-LR3 Gag-Pol polyprotein			6.00	-2.23
La protein homolog	4.77	-0.89	4.87	-2.22
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7	4.63	-0.73	4.87	-2.21
Protein SSD1	5.46	-0.90	4.83	-2.20
60S ribosomal protein L8-A	6.91	-0.85	6.61	-2.18
60S ribosomal protein L8-B	6.91	-0.85	6.64	-2.16
60S ribosomal protein L2-A	7.26	-0.77	6.78	-2.12
Probable alpha-1,6-mannosyltransferase MNN10			3.91	-2.10
60S ribosomal protein L19-A	7.06	-0.90	6.93	-2.10
U3 small nucleolar RNA-associated protein 15	4.81	-0.87	4.79	-2.09
Nucleoporin NUP57			4.59	-2.07
60S ribosomal protein L4-B	7.27	-0.83	6.73	-2.05
60S ribosomal protein L4-A	7.28	-0.82	6.73	-2.05
Myosin-4			3.93	-2.03
Uncharacterized protein YKL075C			4.35	-2.00
60S acidic ribosomal protein P2-alpha	7.35	0.18	6.08	-2.00
Silent chromatin protein ESC1			3.00	-1.98
Vacuolar-sorting protein SNF7	5.57	0.23	3.97	-1.98
Replication factor C subunit 5	4.53	-1.25	3.87	-1.98
Casein kinase I homolog HRR25	4.46	-0.63	4.16	-1.97
Serine/threonine-protein kinase GCN2			3.64	-1.95
U3 small nucleolar RNA-associated protein 5	4.65	-0.73	4.26	-1.95
rRNA-processing protein EFG1	4.83	-0.72	4.30	-1.93
Transcription elongation factor SPT5	5.83	-0.58	5.64	-1.91
60S ribosomal protein L30	7.01	-0.71	6.41	-1.88
Ribosome assembly protein RRB1	4.92	-0.17	4.34	-1.85
Protein HRB1			4.27	-1.81

60S ribosomal protein L33-B	6.96	-0.25	6.44	-1.77
Protein BCH2			3.47	-1.76
60S ribosomal protein L33-A	7.10	-0.27	6.56	-1.76
Nucleoporin GLE2			3.82	-1.75
Nucleolar protein 6	5.01	-0.54	4.84	-1.72
Serine/threonine-protein kinase KIN2			4.14	-1.72
Protein PBP4	5.04	-0.86	5.66	-1.69
60S ribosomal protein L7-B	7.17	-0.28	6.85	-1.63
60S ribosomal protein L7-A	7.17	-0.25	6.84	-1.62
Aldehyde dehydrogenase 5, mitochondrial	5.40	-0.05	5.01	-1.59
60S ribosomal protein L16-B	6.95	-0.24	6.76	-1.52
Histone H2B.1			6.91	-1.48
40S ribosomal protein S8-A	7.34	-0.20	7.25	-1.38
60S ribosomal protein L13-B	7.71	0.31	7.29	-1.37
60S ribosomal protein L34-B	6.64	-0.17	6.66	-1.35
60S ribosomal protein L6-B	7.25	-0.29	6.96	-1.32
60S ribosomal protein L13-A	7.71	0.34	7.22	-1.32
40S ribosomal protein S11-A	7.14	-0.34	7.05	-1.30
60S ribosomal protein L6-A	7.30	-0.31	7.00	-1.30
60S ribosomal protein L16-A	6.77	-0.23	6.61	-1.29
60S ribosomal protein L42-A	5.88	-0.23	5.98	-1.28
Actin cytoskeleton-regulatory complex protein PAN1	4.93	-0.17	4.89	-1.24
Protein transport protein SEC13	6.03	-0.72	6.17	-1.18
Suppressor protein STM1	7.15	-0.40	6.36	-1.11
60S ribosomal protein L5	6.90	-0.38	5.57	-1.11
60S ribosomal protein L28	7.47	0.02	6.94	-1.08
Non-classical export protein 2			5.97	-1.05
40S ribosomal protein S4-A	7.17	-0.25	6.68	-0.98

6.7.4 Interaktionspartner des Mediatorkomplexes (HitPredict)

Anhang 22 Auflistung aller Interaktionspartner aller 25 Mediatoruntereinheiten der Datenbank HitPredict (López et al., 2015), die nicht im Rahmen der Analyse als signifikante Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Alle gelisteten Interaktionen wurden nach *high confidence* gefiltert. Die Zahl in der Tabelle entspricht der Anzahl der Mediatoruntereinheiten, bei denen eine Interaktion mit dem aufgelisteten Protein experimentell beobachtet werden konnte.

Name	Interaktion mit __ Mediatoruntereinheiten beschrieben	Name	Interaktion mit __ Mediatoruntereinheiten beschrieben
HSP75	22	GCN2	1
HSP71	17	GRP78	1
HSP72	17	HAT2	1
HSP7F	11	HSP7Q	1
HSP76	10	IF4A	1
RCK1	5	IF4E	1
SSZ1	5	IME1	1
GAL80	4	JEM1	1
HSP82	4	KCC2	1
GAL4	3	KIN28	1
HSP7E	3	LSM12	1
ADH1	2	MCM1	1
CYC8	2	MDS3	1
HMT1	2	NOT2	1

HS104	2	PAF1	1
HSC82	2	PCH2	1
HSP73	2	PFD6	1
HSP77	2	PGK	1
HSP78	2	PMD1	1
HSP79	2	PMG1	1
MASS5	2	POP8	1
MYO3	2	PSA1	1
MYO5	2	PUR3	1
PHO85	2	RAD2	1
RIO1	2	RIO2	1
SIS1	2	RL16A	1
YAP6	2	RL16B	1
ALF	1	RM06	1
APP1	1	RM09	1
ARGR1	1	RMR1	1
ARPC1	1	RPN10	1
BEM2	1	RRT13	1
Name	Interaktion mit __ Mediatoruntereinheiten beschrieben	Name	Interaktion mit __ Mediatoruntereinheiten beschrieben
BFR1	1	RUVB1	1
CAF4	1	RUXE	1
CCR4	1	RXT3	1
CDC48	1	SAS10	1
CDC7	1	SC160	1
CSK21	1	SDH3	1
CWC27	1	SEC23	1
DBF2	1	SHH3	1
DCC1	1	SIP4	1
DJP1	1	SNAPN	1
EF1A	1	STE12	1
EI2BB	1	TBA1	1
EIF3A	1	TBB	1
ENO2	1	TCPB	1
FAB1	1	TSR1	1
FPPS	1	UBC13	1
VPS65	1	YIH7	1
YAP4	1	YL358	1
YG5B	1	YRR1	1

Literaturverzeichnis

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

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

Alberts, B., and Lodish, H. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (Garland New York: Scientific American Books).

Allen, B.L., and Taatjes, D.J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 155–166.

Anandhakumar, J., Moustafa, Y.W., Chowdhary, S., Kainth, A.S., and Gross, D.S. (2016). Evidence for Multiple Mediator Complexes in Yeast Independently Recruited by Activated Heat Shock Factor. *Mol. Cell. Biol.*

Andrau, J.-C., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M.G., van de Peppel, J., Werner, M., and Holstege, F.C.P. (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol. Cell* 22, 179–192.

Ansari, S.A., and Morse, R.H. (2012). Selective role of Mediator tail module in the transcription of highly regulated genes in yeast. *Transcription* 3, 110–114.

Ansari, S.A., and Morse, R.H. (2013). Mechanisms of Mediator complex action in transcriptional activation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 2743–2756.

Ansari, S.A., He, Q., and Morse, R.H. (2009). Mediator complex association with constitutively transcribed genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16734–16739.

Ansari, S.A., Ganapathi, M., Benschop, J.J., Holstege, F.C.P., Wade, J.T., and Morse, R.H. (2012). Distinct role of Mediator tail module in regulation of SAGA-dependent, TATA-containing genes in yeast. *EMBO J.* 31, 44–57.

Ansari, S.A., Paul, E., Sommer, S., Lieleg, C., He, Q., Daly, A.Z., Rode, K.A., Barber, W.T., Ellis, L.C., LaPorta, E., et al. (2014). Mediator, TATA-binding protein, and RNA polymerase II contribute to low histone occupancy at active gene promoters in yeast. *J. Biol. Chem.* 289, 14981–14995.

Askree, S.H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., Coker, C., Krauskopf, A., Kupiec, M., and McEachern, M.J. (2004). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8658–8663.

Babu, M., Vlasblom, J., Pu, S., Guo, X., Graham, C., Bean, B.D.M., Burston, H.E., Vizeacoumar, F.J., Snider, J., Phanse, S., et al. (2012). Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 489, 585–589.

Baidoobonso, S.M., Guidi, B.W., and Myers, L.C. (2007). Med19(Rox3) regulates Intermodule interactions in the *Saccharomyces cerevisiae* mediator complex. *J. Biol. Chem.* 282, 5551–5559.

Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M., and Kuster, B. (2012). Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 939–965.

- Basehoar, A.D., Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 116, 699–709.
- Beavis, R.C., and Chait, B.T. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 3, 432–435.
- Beck, T., and Hall, M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689–692.
- Bernstein, B.E., Liu, C.L., Humphrey, E.L., Perlstein, E.O., and Schreiber, S.L. (2004). Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol.* 5, R62.
- Béve, J., Hu, G.-Z., Myers, L.C., Balciunas, D., Werngren, O., Hultenby, K., Wibom, R., Ronne, H., and Gustafsson, C.M. (2005). The structural and functional role of Med5 in the yeast Mediator tail module. *J. Biol. Chem.* 280, 41366–41372.
- Bharucha, N., Ma, J., Dobry, C.J., Lawson, S.K., Yang, Z., and Kumar, A. (2008). Analysis of the yeast kinome reveals a network of regulated protein localization during filamentous growth. *Mol. Biol. Cell* 19, 2708–2717.
- Bhaumik, S.R., and Green, M.R. (2001). SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.* 15, 1935–1945.
- Biemann, K. (1990). Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* 193, 886–887.
- Blaiseau, P.L., Isnard, A.D., Surdin-Kerjan, Y., and Thomas, D. (1997). Met31p and Met32p, two related zinc finger proteins, are involved in transcriptional regulation of yeast sulfur amino acid metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3640–3648.
- Bojunga, N., and Entian, K.D. (1999). Cat8p, the activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, regulates carbon source-dependent expression of NADP-dependent cytosolic isocitrate dehydrogenase (Idp2p) and lactate permease (Jen1p). *Mol. Gen. Genet.* MGG 262, 869–875.
- Borggreffe, T., Davis, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R.D. (2002). A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 44202–44207.
- Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D.L., and Bourbon, H.-M. (2002). Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell* 110, 143–151.
- Bourbon, H.-M. (2008). Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res.* 36, 3993–4008.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brauer, M.J., Saldanha, A.J., Dolinski, K., and Botstein, D. (2005). Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Mol. Biol. Cell* 16, 2503–2517.
- Butler, J.E.F., and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16, 2583–2592.

- Cai, G., Imasaki, T., Yamada, K., Cardelli, F., Takagi, Y., and Asturias, F.J. (2010). Mediator head module structure and functional interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 273–279.
- Carlsten, J.O.P. (2014). Mediator and its role in non-coding RNA and chromatin regulation. Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg.
- Carlsten, J.O.P., Zhu, X., and Gustafsson, C.M. (2013). The multitasking Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 531–537.
- Carlsten, J.O.P., Zhu, X., López, M.D., Samuelsson, T., and Gustafsson, C.M. (2016). Loss of the Mediator subunit Med20 affects transcription of tRNA and other non-coding RNA genes in fission yeast. *Biochim. Biophys. Acta* *1859*, 339–347.
- Cena, A., Skoneczny, M., Chęstowska, A., Kowalec, P., Natorff, R., and Kurlandzka, A. (2013). Cohesin Irr1/Scc3 is likely to influence transcription in *Saccharomyces cerevisiae* via interaction with Mediator complex. *Acta Biochim. Pol.* *60*, 233–238.
- Cevher, M.A., Shi, Y., Li, D., Chait, B.T., Malik, S., and Roeder, R.G. (2014). Reconstitution of active human core Mediator complex reveals a critical role of the MED14 subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 1028–1034.
- Challice, J.M., and Segall, J. (1989). Transcription of the 5 S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. *J. Biol. Chem.* *264*, 20060–20067.
- Chang, Y.-W., Howard, S.C., and Herman, P.K. (2004). The Ras/PKA signaling pathway directly targets the Srb9 protein, a component of the general RNA polymerase II transcription apparatus. *Mol. Cell* *15*, 107–116.
- Chereji, R.V., Bharatula, V., Elfving, N., Blomberg, J., Larsson, M., Morozov, A.V., Broach, J.R., and Björklund, S. (2017). Mediator binds to boundaries of chromosomal interaction domains and to proteins involved in DNA looping, RNA metabolism, chromatin remodeling, and actin assembly. *Nucleic Acids Res.* *45*, 8806–8821.
- Chi, Y., Huddleston, M.J., Zhang, X., Young, R.A., Annan, R.S., Carr, S.A., and Deshaies, R.J. (2001). Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev.* *15*, 1078–1092.
- 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, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev.* *15*, 3319–3329.
- Claypool, J.A., French, S.L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J.A., Beyer, A.L., and Nomura, M. (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol. Biol. Cell* *15*, 946–956.
- Collins, S.R., Miller, K.M., Maas, N.L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C.S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., et al. (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* *446*, 806–810.

- Comisarow, M.B., and Marshall, A.G. (1996). The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy. *J. Mass Spectrom.* *JMS 31*, 581–585.
- Compe, E., and Egly, J.-M. (2012). TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 343–354.
- Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* *62*, 161–190.
- Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2013). The Mediator complex and transcription elongation. *Biochim. Biophys. Acta 1829*, 69–75.
- Cook, P.R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science 284*, 1790–1795.
- Cook, P.R. (2010). A model for all genomes: the role of transcription factories. *J. Mol. Biol.* *395*, 1–10.
- Cornuel, J.F., Moraillon, A., and Guéron, M. (2002). Participation of yeast inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in an in vitro complex with a fragment of the C-rich telomeric strand. *Biochimie 84*, 279–289.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L.Y., Toufighi, K., Mostafavi, S., et al. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science 327*, 425–431.
- Cubizolles, F., Martino, F., Perrod, S., and Gasser, S.M. (2006). A homotrimer-heterotrimer switch in Sir2 structure differentiates rDNA and telomeric silencing. *Mol. Cell 21*, 825–836.
- Cui, Z., Hirata, D., and Miyakawa, T. (1999). Functional analysis of the promoter of the yeast SNQ2 gene encoding a multidrug resistance transporter that confers the resistance to 4-nitroquinoline N-oxide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *63*, 162–167.
- Dang, W., Steffen, K.K., Perry, R., Dorsey, J.A., Johnson, F.B., Shilatifard, A., Kaeberlein, M., Kennedy, B.K., and Berger, S.L. (2009). Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature 459*, 802–807.
- Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D., and Asturias, F.A. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol. Cell 10*, 409–415.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006). The TOR signalling network from yeast to man. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1476–1481.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science 278*, 680–686.
- Dettmann, A., Jäschke, Y., Triebel, I., Bogs, J., Schröder, I., and Schüller, H.-J. (2010). Mediator subunits and histone methyltransferase Set2 contribute to Ino2-dependent transcriptional activation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics MGG 283*, 211–221.
- Deutscher, Murray P. (1982). tRNA nucleotidyltransferase. *The Enzymes 183–215*.
- Doerr, A. (2012). Interactomes by mass spectrometry. *Nat. Methods 9*, 1043.

- Donner, A.J., Ebmeier, C.C., Taatjes, D.J., and Espinosa, J.M. (2010). CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 194–201.
- Dotson, M.R., Yuan, C.X., Roeder, R.G., Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Jiang, Y.W., Li, Y., Kornberg, R.D., and Asturias, F.J. (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14307–14310.
- El Yacoubi, B., Bailly, M., and de Crécy-Lagard, V. (2012). Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 69–95.
- Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C.O., Koeck, P.J.B., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C.M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 15788–15793.
- Engel, C. (2013). RNA polymerase I structure and transcription regulation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Erik Haaf (2012). Qualitative und quantitative Analyse der Phosphorylierung von Proteinen der circadianen Uhr. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Esnault, C., Ghavi-Helm, Y., Brun, S., Soutourina, J., Van Berkum, N., Boschiero, C., Holstege, F., and Werner, M. (2008). Mediator-dependent recruitment of TFIID modules in preinitiation complex. *Mol. Cell* *31*, 337–346.
- Eyboulet, F., Cibot, C., Eychenne, T., Neil, H., Alibert, O., Werner, M., and Soutourina, J. (2013). Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. *Genes Dev.* *27*, 2549–2562.
- Falick, A.M., Hines, W.M., Medzihradzky, K.F., Baldwin, M.A., and Gibson, B.W. (1993). Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *4*, 882–893.
- Fan, X., and Struhl, K. (2009). Where does mediator bind in vivo? *PLoS One* *4*, e5029.
- Fan, X., Chou, D.M., and Struhl, K. (2006). Activator-specific recruitment of Mediator in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 117–120.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L., and Kornberg, R.D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIID/TFIIK. *Cell* *79*, 1103–1109.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* *246*, 64–71.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., and Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6982–6993.
- Flanagan, P.M., Kelleher, R.J., Sayre, M.H., Tschochner, H., and Kornberg, R.D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* *350*, 436–438.
- Friedrich Lottspeich, and Haralabos Zorbas (1998). *Bioanalytik* (Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., and Thuriaux, P. (2002). Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.* *21*, 5498–5507.
- Gaillard, H., Tous, C., Botet, J., González-Aguilera, C., Quintero, M.J., Viladevall, L., García-Rubio, M.L., Rodríguez-Gil, A., Marín, A., Ariño, J., et al. (2009). Genome-wide analysis of factors affecting transcription elongation and DNA repair: a new role for PAF and Ccr4-not in transcription-coupled repair. *PLoS Genet.* *5*, e1000364.
- Gallardo, M., Luna, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Aguilera, A. (2003). Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *J. Biol. Chem.* *278*, 24225–24232.
- Gao, J., Opiteck, G.J., Friedrichs, M.S., Dongre, A.R., and Hefta, S.A. (2003). Changes in the protein expression of yeast as a function of carbon source. *J. Proteome Res.* *2*, 643–649.
- Garas, M., Dichtl, B., and Keller, W. (2008). The role of the putative 3' end processing endonuclease Ysh1p in mRNA and snoRNA synthesis. *RNA N. Y. N* *14*, 2671–2684.
- García Alonso, J.I., Rodríguez-González, P., González-Gago, A., and González-Antuña, A. (2010). Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules. *Anal. Chim. Acta* *664*, 68–76.
- Gavin, A.-C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dümpelfeld, B., et al. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* *440*, 631–636.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* *350*, 87–96.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 913–963.
- de Godoy, L.M.F., Olsen, J.V., Cox, J., Nielsen, M.L., Hubner, N.C., Fröhlich, F., Walther, T.C., and Mann, M. (2008). Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature* *455*, 1251–1254.
- Gonzalez, D., Hamidi, N., Del Sol, R., Benschop, J.J., Nancy, T., Li, C., Francis, L., Tzouros, M., Krijgsveld, J., Holstege, F.C.P., et al. (2014). Suppression of Mediator is regulated by Cdk8-dependent Grr1 turnover of the Med3 coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 2500–2505.
- Görlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E., Laskey, R.A., Mattaj, I.W., and Izaurralde, E. (1996). Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export. *Cell* *87*, 21–32.
- Gromöller, A., and Lehming, N. (2000). Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *EMBO J.* *19*, 6845–6852.
- Grünberg, S., and Zentner, G.E. (2017). Genome-wide characterization of Mediator recruitment, function, and regulation. *Transcription* e1291082.
- Grunstein, M. (1997). Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 383–387.

- Guglielmi, B., van Berkum, N.L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H.-M., Holstege, F.C.P., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res.* *32*, 5379–5391.
- Guglielmi, B., Soutourina, J., Esnault, C., and Werner, M. (2007). TFIIIS elongation factor and Mediator act in conjunction during transcription initiation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16062–16067.
- Haaf, E., and Schlosser, A. (2012). Peptide and protein quantitation by acid-catalyzed ¹⁸O-labeling of carboxyl groups. *Anal. Chem.* *84*, 304–311.
- Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 394–403.
- Hakhverdyan, Z., Domanski, M., Hough, L.E., Oroskar, A.A., Oroskar, A.R., Keegan, S., Dilworth, D.J., Molloy, K.R., Sherman, V., Aitchison, J.D., et al. (2015). Rapid, optimized interactomic screening. *Nat. Methods* *12*, 553–560.
- Hallberg, M., Polozkov, G.V., Hu, G.-Z., Beve, J., Gustafsson, C.M., Ronne, H., and Björklund, S. (2004). Site-specific Srb10-dependent phosphorylation of the yeast Mediator subunit Med2 regulates gene expression from the 2-microm plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3370–3375.
- Han, M., Kim, U.J., Kayne, P., and Grunstein, M. (1988). Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the PHO5 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *7*, 2221–2228.
- Hanawalt, P.C., and Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 958–970.
- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14866–14870.
- Harper, T.M., and Taatjes, D.J. (2017). The complex structure and function of Mediator. *J. Biol. Chem.*
- Hein, M.Y., Hubner, N.C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., Gak, I.A., Weisswange, I., Mansfeld, J., Buchholz, F., et al. (2015). A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* *163*, 712–723.
- 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.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., and Chait, B.T. (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* *63*, 1193A–1203A.
- Hinnebusch, A.G., and Natarajan, K. (2002). Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot. Cell* *1*, 22–32.
- Hirst, M., Kobor, M.S., Kuriakose, N., Greenblatt, J., and Sadowski, I. (1999). GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclin-dependent protein kinase SRB10/CDK8. *Mol. Cell* *3*, 673–678.

- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717–728.
- Hsieh, T.-H.S., Weiner, A., Lajoie, B., Dekker, J., Friedman, N., and Rando, O.J. (2015). Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C. *Cell* 162, 108–119.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O’Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.
- Huisinga, K.L., and Pugh, B.F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 13, 573–585.
- Ibarra, A., and Hetzer, M.W. (2015). Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes Dev.* 29, 337–349.
- Iborra, F.J., Pombo, A., Jackson, D.A., and Cook, P.R. (1996). Active RNA polymerases are localized within discrete transcription “factories” in human nuclei.” *J. Cell Sci.* 109 (Pt 6), 1427–1436.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., and Cook, P.R. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* 12, 1059–1065.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* Chichester Engl. 21, 947–962.
- Jedidi, I., Zhang, F., Qiu, H., Stahl, S.J., Palmer, I., Kaufman, J.D., Nadaud, P.S., Mukherjee, S., Wingfield, P.T., Jaroniec, C.P., et al. (2010). Activator Gcn4 employs multiple segments of Med15/Gal11, including the KIX domain, to recruit mediator to target genes in vivo. *J. Biol. Chem.* 285, 2438–2455.
- Jeronimo, C., and Robert, F. (2014). Kin28 regulates the transient association of Mediator with core promoters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 449–455.
- Jeronimo, C., Langelier, M.-F., Bataille, A.R., Pascal, J.M., Pugh, B.F., and Robert, F. (2016). Tail and Kinase Modules Differently Regulate Core Mediator Recruitment and Function In Vivo. *Mol. Cell* 64, 455–466.
- Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 355–382.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430–435.
- Kang, J.S., Kim, S.H., Hwang, M.S., Han, S.J., Lee, Y.C., and Kim, Y.J. (2001). The structural and functional organization of the yeast mediator complex. *J. Biol. Chem.* 276, 42003–42010.
- Kassavetis, G.A., and Geiduschek, E.P. (2006). Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1082–1087.
- Kelleher, R.J., Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61, 1209–1215.

- Kim, M.-S., and Pandey, A. (2012). Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics* 12, 530–542.
- Kim, S., and Gross, D.S. (2013). Mediator recruitment to heat shock genes requires dual Hsf1 activation domains and mediator tail subunits Med15 and Med16. *J. Biol. Chem.* 288, 12197–12213.
- Kim, B., Nesvizhskii, A.I., Rani, P.G., Hahn, S., Aebersold, R., and Ranish, J.A. (2007). The transcription elongation factor TFIIS is a component of RNA polymerase II preinitiation complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16068–16073.
- Kim, J.M., Vanguri, S., Boeke, J.D., Gabriel, A., and Voytas, D.F. (1998a). Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.* 8, 464–478.
- Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeja, E., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517–522.
- Kim, S., Schilke, B., Craig, E.A., and Horwich, A.L. (1998b). Folding in vivo of a newly translated yeast cytosolic enzyme is mediated by the SSA class of cytosolic yeast Hsp70 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12860–12865.
- Kim, Y.J., Björklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., and Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599–608.
- Kimura, H., Sugaya, K., and Cook, P.R. (2002). The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells. *J. Cell Biol.* 159, 777–782.
- Klekamp, M.S., and Weil, P.A. (1982). Specific transcription of homologous class III genes in yeast-soluble cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* 257, 8432–8441.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast Chichester Engl.* 15, 963–972.
- Koh, S.S., Ansari, A.Z., Ptashne, M., and Young, R.A. (1998). An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* 1, 895–904.
- Kos, M., and Tollervy, D. (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol. Cell* 37, 809–820.
- Kostrewa, D., Zeller, M.E., Armache, K.-J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., and Cramer, P. (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 462, 323–330.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kremer, S.B., Kim, S., Jeon, J.O., Moustafa, Y.W., Chen, A., Zhao, J., and Gross, D.S. (2012). Role of Mediator in regulating Pol II elongation and nucleosome displacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 95–106.

- Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., and Hampsey, M. (2004). Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol. Cell* *14*, 387–394.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., et al. (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 4207–4218.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *440*, 637–643.
- Kufel, J., Dichtl, B., and Tollervey, D. (1999). Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA N. Y. N* *5*, 909–917.
- Kunz, J., Loeschmann, A., Deuter-Reinhard, M., and Hall, M.N. (2000). FAP1, a homologue of human transcription factor NF-X1, competes with rapamycin for binding to FKBP12 in yeast. *Mol. Microbiol.* *37*, 1480–1493.
- Larivière, L., Geiger, S., Hoepfner, S., Röther, S., Strässer, K., and Cramer, P. (2006). Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8-Med18-Med20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 895–901.
- Larivière, L., Plaschka, C., Seizl, M., Wenzek, L., Kurth, F., and Cramer, P. (2012). Structure of the Mediator head module. *Nature* *492*, 448–451.
- Larschan, E., and Winston, F. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 114–123.
- Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., and Jørgensen, T.J.D. (2005). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *4*, 873–886.
- Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C.S. (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell* *13*, 599–609.
- Lemay, J.-F., Lemieux, C., St-André, O., and Bachand, F. (2010). Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol.* *7*, 291–295.
- Lemieux, K., and Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4040–4050.
- Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* *14*, 2551–2569.
- Lesage, P., and Todeschini, A.L. (2005). Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts. *Cytogenet. Genome Res.* *110*, 70–90.
- Lewis, B.A., and Reinberg, D. (2003). The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J. Cell Sci.* *116*, 3667–3675.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* *128*, 707–719.

- Li, W., Yoshida, A., Takahashi, M., Maekawa, M., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kyojuka, J. (2015). SAD1, an RNA polymerase I subunit A34.5 of rice, interacts with Mediator and controls various aspects of plant development. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *81*, 282–291.
- Li, Z., Adams, R.M., Chourey, K., Hurst, G.B., Hettich, R.L., and Pan, C. (2012). Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J. Proteome Res.* *11*, 1582–1590.
- Liu, Z., and Myers, L.C. (2012). Med5(Nut1) and Med17(Srb4) are direct targets of mediator histone H4 tail interactions. *PLoS One* *7*, e38416.
- Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., Friedman, N., and Rando, O.J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol.* *3*, e328.
- Liu, Y., Ranish, J.A., Aebersold, R., and Hahn, S. (2001). Yeast nuclear extract contains two major forms of RNA polymerase II mediator complexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 7169–7175.
- Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A.Z., Shokat, K.M., and Hahn, S. (2004). Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1721–1735.
- Lodish H, Berk A, and Zipursky SL (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th Edition (Palgrave Macmillan).
- Longtine, M.S., Wilson, N.M., Petracek, M.E., and Berman, J. (1989). A yeast telomere binding activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAP1. *Curr. Genet.* *16*, 225–239.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* *50*, 325–328.
- López, Y., Nakai, K., and Patil, A. (2015). HitPredict version 4: comprehensive reliability scoring of physical protein-protein interactions from more than 100 species. *Database J. Biol. Databases Curation* *2015*.
- Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C.M., Myers, L.C., and Kornberg, R.D. (2000). Mediator-nucleosome interaction. *Mol. Cell* *6*, 197–201.
- Louis, E.J. (1995). The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* *11*, 1553–1573.
- Louis, E.J., and Haber, J.E. (1990). The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* *124*, 533–545.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.
- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D., and Séraphin, B. (1996). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* *272*, 268–270.
- Malagon, F., Tong, A.H., Shafer, B.K., and Strathern, J.N. (2004). Genetic interactions of DST1 in *Saccharomyces cerevisiae* suggest a role of TFIIIS in the initiation-elongation transition. *Genetics* *166*, 1215–1227.

- Malik, S., and Roeder, R.G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 761–772.
- Malik, S., Baek, H.J., Wu, W., and Roeder, R.G. (2005). Structural and functional characterization of PC2 and RNA polymerase II-associated subpopulations of metazoan Mediator. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2117–2129.
- Manginot, C., Roustan, J.L., and Sablayrolles, J.M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.* *23*, 511–517.
- Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A., and Gefter, M.L. (1980). DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 3855–3859.
- Marshall, A.G., Hendrickson, C.L., and Jackson, G.S. (1998). Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom. Rev.* *17*, 1–35.
- McLean, J.E., Hamaguchi, N., Belenky, P., Mortimer, S.E., Stanton, M., and Hedstrom, L. (2004). Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids in vitro and in vivo. *Biochem. J.* *379*, 243–251.
- Medzihradszky, K.F. (2005). In-solution digestion of proteins for mass spectrometry. *Methods Enzymol.* *405*, 50–65.
- Meier, A., and Thoma, F. (2005). RNA polymerase I transcription factors in active yeast rRNA gene promoters enhance UV damage formation and inhibit repair. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1586–1595.
- Melnik, S., Deng, B., Papantonis, A., Baboo, S., Carr, I.M., and Cook, P.R. (2011). The proteomes of transcription factories containing RNA polymerases I, II or III. *Nat. Methods* *8*, 963–968.
- Merkhofer, E.C., Hu, P., and Johnson, T.L. (2014). Introduction to cotranscriptional RNA splicing. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1126*, 83–96.
- Meyer, K.D., Lin, S.-C., Bernecky, C., Gao, Y., and Taatjes, D.J. (2010). p53 activates transcription by directing structural shifts in Mediator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 753–760.
- Miller, O.L., and Hamkalo, B.A. (1972). Visualization of RNA synthesis on chromosomes. *Int. Rev. Cytol.* *33*, 1–25.
- Miller, C., Matic, I., Maier, K.C., Schwalb, B., Roether, S., Strässer, K., Tresch, A., Mann, M., and Cramer, P. (2012). Mediator phosphorylation prevents stress response transcription during non-stress conditions. *J. Biol. Chem.* *287*, 44017–44026.
- 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.
- Mukundan, B., and Ansari, A. (2011). Novel role for mediator complex subunit Srb5/Med18 in termination of transcription. *J. Biol. Chem.* *286*, 37053–37057.
- Mukundan, B., and Ansari, A. (2013). Srb5/Med18-mediated termination of transcription is dependent on gene looping. *J. Biol. Chem.* *288*, 11384–11394.

- Muthukrishnan, S., Both, G.W., Furuichi, Y., and Shatkin, A.J. (1975). 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature* 255, 33–37.
- Myers, L.C., and Kornberg, R.D. (2000a). Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 729–749.
- Myers, L.C., and Kornberg, R.D. (2000b). Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 729–749.
- Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Bushnell, D.A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R.D. (1998). The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 12, 45–54.
- Nag, A., Narsinh, K., and Martinson, H.G. (2007). The poly(A)-dependent transcriptional pause is mediated by CPSF acting on the body of the polymerase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 662–669.
- Natarajan, K., Jackson, B.M., Zhou, H., Winston, F., and Hinnebusch, A.G. (1999). Transcriptional activation by Gcn4p involves independent interactions with the SWI/SNF complex and the SRB/mediator. *Mol. Cell* 4, 657–664.
- Nelson, C., Goto, S., Lund, K., Hung, W., and Sadowski, I. (2003). Srb10/Cdk8 regulates yeast filamentous growth by phosphorylating the transcription factor Ste12. *Nature* 421, 187–190.
- Ng, H.H., and Bird, A. (2000). Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.* 25, 121–126.
- Niles, R., Witkowska, H.E., Allen, S., Hall, S.C., Fisher, S.J., and Hardt, M. (2009). Acid-catalyzed oxygen-18 labeling of peptides. *Anal. Chem.* 81, 2804–2809.
- Nuss, D.L., Furuichi, Y., Koch, G., and Shatkin, A.J. (1975). Detection in HeLa cell extracts of a 7-methyl guanosine specific enzyme activity that cleaves m7GpppNm. *Cell* 6, 21–27.
- Oeffinger, M., Wei, K.E., Rogers, R., DeGrasse, J.A., Chait, B.T., Aitchison, J.D., and Rout, M.P. (2007). Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat. Methods* 4, 951–956.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Olsen, J.V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., and Mann, M. (2007). Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods* 4, 709–712.
- Olsen, J.V., Schwartz, J.C., Griep-Raming, J., Nielsen, M.L., Damoc, E., Denisov, E., Lange, O., Remes, P., Taylor, D., Splendore, M., et al. (2009). A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 2759–2769.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 1, 376–386.
- Orioli, A., Pascali, C., Pagano, A., Teichmann, M., and Dieci, G. (2012). RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene* 493, 185–194.

- Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J., and Beyer, A.L. (2004). Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* *16*, 943–954.
- O’Sullivan, J.M., Tan-Wong, S.M., Morillon, A., Lee, B., Coles, J., Mellor, J., and Proudfoot, N.J. (2004). Gene loops juxtapose promoters and terminators in yeast. *Nat. Genet.* *36*, 1014–1018.
- Ottaviani, A., Gilson, E., and Magdinier, F. (2008). Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies? *Biochimie* *90*, 93–107.
- Park, J.M., Werner, J., Kim, J.M., Lis, J.T., and Kim, Y.J. (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol. Cell* *8*, 9–19.
- Paul, E., Zhu, Z.I., Landsman, D., and Morse, R.H. (2015). Genome-wide association of mediator and RNA polymerase II in wild-type and mediator mutant yeast. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 331–342.
- Peng, J., and Zhou, J.-Q. (2012). The tail-module of yeast Mediator complex is required for telomere heterochromatin maintenance. *Nucleic Acids Res.* *40*, 581–593.
- van de Peppel, J., Kettelarij, N., van Bakel, H., Kockelkorn, T.T.J.P., van Leenen, D., and Holstege, F.C.P. (2005). Mediator expression profiling epistasis reveals a signal transduction pathway with antagonistic submodules and highly specific downstream targets. *Mol. Cell* *19*, 511–522.
- Petrenko, N., Jin, Y., Wong, K.H., and Struhl, K. (2016). Mediator Undergoes a Compositional Change during Transcriptional Activation. *Mol. Cell* *64*, 443–454.
- Plaschka, C., Larivière, L., Wenzek, L., Seizl, M., Hemann, M., Tegunov, D., Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H., Baumeister, W., Herzog, F., et al. (2015). Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. *Nature* *518*, 376–380.
- Porrua, O., and Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 190–202.
- Poss, Z.C., Ebmeier, C.C., and Taatjes, D.J. (2013). The Mediator complex and transcription regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *48*, 575–608.
- Prakash, S., and Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res.* *451*, 13–24.
- Radonjic, M., Andrau, J.-C., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Kockelkorn, T.T.J.P., van Leenen, D., van Berkum, N.L., and Holstege, F.C.P. (2005). Genome-wide analyses reveal RNA polymerase II located upstream of genes poised for rapid response upon *S. cerevisiae* stationary phase exit. *Mol. Cell* *18*, 171–183.
- Raithatha, S., Su, T.-C., Lourenco, P., Goto, S., and Sadowski, I. (2012). Cdk8 regulates stability of the transcription factor Phd1 to control pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 664–674.
- Rani, P.G., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2004). RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-mediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 1709–1720.
- Renato Zenobi, and Richard Knochenmuss (1998). Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* *17*, 337–366.

- Rieder, D., Trajanoski, Z., and McNally, J.G. (2012). Transcription factories. *Front. Genet.* *3*, 221.
- Rippe, K., Schrader, A., Riede, P., Strohner, R., Lehmann, E., and Längst, G. (2007). DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15635–15640.
- Rispaal, D., Eltschinger, S., Stahl, M., Vaga, S., Bodenmiller, B., Abraham, Y., Filipuzzi, I., Movva, N.R., Aebersold, R., Helliwell, S.B., et al. (2015). Target of Rapamycin Complex 2 Regulates Actin Polarization and Endocytosis via Multiple Pathways. *J. Biol. Chem.* *290*, 14963–14978.
- Robinson, P.J., Trnka, M.J., Pellarin, R., Greenberg, C.H., Bushnell, D.A., Davis, R., Burlingame, A.L., Sali, A., and Kornberg, R.D. (2015). Molecular architecture of the yeast Mediator complex. *ELife* *4*.
- Robinson, P.J., Trnka, M.J., Bushnell, D.A., Davis, R.E., Mattei, P.-J., Burlingame, A.L., and Kornberg, R.D. (2016). Structure of a Complete Mediator-RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Cell* *166*, 1411–1422.e16.
- Robinson, P.J.J., Bushnell, D.A., Trnka, M.J., Burlingame, A.L., and Kornberg, R.D. (2012). Structure of the mediator head module bound to the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17931–17935.
- Roepstorff, P., and Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* *11*, 601.
- Rosonina, E., Willis, I.M., and Manley, J.L. (2009). Sub1 functions in osmoregulation and in transcription by both RNA polymerases II and III. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2308–2321.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *3*, 1154–1169.
- Sakurai, H., Kim, Y.J., Ohishi, T., Kornberg, R.D., and Fukasawa, T. (1996). The yeast GAL11 protein binds to the transcription factor IIE through GAL11 regions essential for its in vivo function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 9488–9492.
- Sato, T., Lopez, M.C., Sugioka, S., Jigami, Y., Baker, H.V., and Uemura, H. (1999). The E-box DNA binding protein Sgc1p suppresses the *gcr2* mutation, which is involved in transcriptional activation of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *463*, 307–311.
- Schafer, D.A., Gelles, J., Sheetz, M.P., and Landick, R. (1991). Transcription by single molecules of RNA polymerase observed by light microscopy. *Nature* *352*, 444–448.
- Schneider, B.L., Seufert, W., Steiner, B., Yang, Q.H., and Futcher, A.B. (1995). Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* *11*, 1265–1274.
- Schneider, M., Hellerschmied, D., Schubert, T., Amlacher, S., Vinayachandran, V., Reja, R., Pugh, B.F., Clausen, T., and Köhler, A. (2015). The Nuclear Pore-Associated TREX-2 Complex Employs Mediator to Regulate Gene Expression. *Cell* *162*, 1016–1028.
- Schüller, J., and Lehming, N. (2003). The cyclin in the RNA polymerase holoenzyme is a target for the transcriptional repressor Tup1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *5*, 199–205.

- Scigelova, M., and Makarov, A. (2006). Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 *Suppl* 2, 16–21.
- Shahi, P., Gulshan, K., Näär, A.M., and Moye-Rowley, W.S. (2010). Differential roles of transcriptional mediator subunits in regulation of multidrug resistance gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21, 2469–2482.
- Sharon, N., Grisaro, V., and Neumann, H. (1962). Pepsin-catalyzed exchange of oxygen atoms between water and carboxylic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 219–221.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Shiio, Y., and Aebersold, R. (2006). Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 1, 139–145.
- Shou, W., Sakamoto, K.M., Keener, J., Morimoto, K.W., Traverso, E.E., Azzam, R., Hoppe, G.J., Feldman, R.M., DeModena, J., Moazed, D., et al. (2001). Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol. Cell* 8, 45–55.
- Shulga, N., James, P., Craig, E.A., and Goldfarb, D.S. (1999). A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *J. Biol. Chem.* 274, 16501–16507.
- Shuman, S., and Schwer, B. (1995). RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. *Mol. Microbiol.* 17, 405–410.
- Sikorski, T.W., and Buratowski, S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 344–351.
- Sikorski, T.W., Ficarro, S.B., Holik, J., Kim, T., Rando, O.J., Marto, J.A., and Buratowski, S. (2011). Sub1 and RPA associate with RNA polymerase II at different stages of transcription. *Mol. Cell* 44, 397–409.
- Smits, A.H., Jansen, P.W.T.C., Poser, I., Hyman, A.A., and Vermeulen, M. (2013). Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Nucleic Acids Res.* 41, e28.
- Søgaard, T.M.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.
- Soutourina, J., Wydau, S., Ambroise, Y., Boschiero, C., and Werner, M. (2011). Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science* 331, 1451–1454.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., and Ares, M. (1999a). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA N. Y. N* 5, 221–234.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., and Ares, M. (1999b). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA N. Y. N* 5, 221–234.
- Stewart, I.I., Thomson, T., and Figeys, D. (2001). ¹⁸O labeling: a tool for proteomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 15, 2456–2465.

- Straight, A.F., Shou, W., Dowd, G.J., Turck, C.W., Deshaies, R.J., Johnson, A.D., and Moazed, D. (1999). Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* *97*, 245–256.
- Subbotin, R.I., and Chait, B.T. (2014). A pipeline for determining protein-protein interactions and proximities in the cellular milieu. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *13*, 2824–2835.
- Svejstrup, J.Q., Petrakis, T.G., and Fellows, J. (2003). Purification of elongating RNA polymerase II and other factors from yeast chromatin. *Methods Enzymol.* *371*, 491–498.
- Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2004). Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9528–9533.
- T. D. Pollard, and W. C. Earnshaw (2008). *Cell Biology* (Spektrum Akademischer Verlag).
- Taatjes, D.J., and Tjian, R. (2004). Structure and function of CRSP/Med2; a promoter-selective transcriptional coactivator complex. *Mol. Cell* *14*, 675–683.
- Taatjes, D.J., Schneider-Poetsch, T., and Tjian, R. (2004). Distinct conformational states of nuclear receptor-bound CRSP-Med complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 664–671.
- Takagi, Y., Chadick, J.Z., Davis, J.A., and Asturias, F.J. (2005). Preponderance of free mediator in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *280*, 31200–31207.
- Takahashi, H., Parmely, T.J., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Banks, C.A.S., Kong, S.E., Szutorisz, H., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Washburn, M.P., et al. (2011). Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell* *146*, 92–104.
- Tan-Wong, S.M., Wijayatilake, H.D., and Proudfoot, N.J. (2009). Gene loops function to maintain transcriptional memory through interaction with the nuclear pore complex. *Genes Dev.* *23*, 2610–2624.
- Tardiff, D.F., Lacadie, S.A., and Rosbash, M. (2006). A genome-wide analysis indicates that yeast pre-mRNA splicing is predominantly posttranscriptional. *Mol. Cell* *24*, 917–929.
- Thakur, J.K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S.-J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D.P., Gulshan, K., Li, D.K., Mylonakis, E., et al. (2008). A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* *452*, 604–609.
- Thakur, J.K., Arthanari, H., Yang, F., Chau, K.H., Wagner, G., and Näär, A.M. (2009). Mediator subunit Gal11p/MED15 is required for fatty acid-dependent gene activation by yeast transcription factor Oaf1p. *J. Biol. Chem.* *284*, 4422–4428.
- Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S.V., Chiba, T., Ito, T., and Uetz, P. (2006). Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Res.* *34*, 955–967.
- Tóth-Petróczy, A., Oldfield, C.J., Simon, I., Takagi, Y., Dunker, A.K., Uversky, V.N., and Fuxreiter, M. (2008). Malleable machines in transcription regulation: the mediator complex. *PLoS Comput. Biol.* *4*, e1000243.

- Trotta, C.R., Miao, F., Arn, E.A., Stevens, S.W., Ho, C.K., Rauhut, R., and Abelson, J.N. (1997). The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases. *Cell* *89*, 849–858.
- Tsai, K.-L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Asturias, F.J. (2013). A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 611–619.
- Tsai, K.-L., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Asturias, F.J. (2014). Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional mediator complex. *Cell* *157*, 1430–1444.
- Tsang, C.K., Qi, H., Liu, L.F., and Zheng, X.F.S. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov. Today* *12*, 112–124.
- Udem, S.A., and Warner, J.R. (1973). The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J. Biol. Chem.* *248*, 1412–1416.
- Umekawa, M., and Klionsky, D.J. (2012). Ksp1 kinase regulates autophagy via the target of rapamycin complex 1 (TORC1) pathway. *J. Biol. Chem.* *287*, 16300–16310.
- Uthe, H., Vanselow, J.T., and Schlosser, A. (2017). Proteomic Analysis of the Mediator Complex Interactome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* *7*, 43584.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E., and Workman, J.L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1899–1910.
- Wang, X., and Huang, L. (2014). Defining dynamic protein interactions using SILAC-based quantitative mass spectrometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1188*, 191–205.
- Wang, G., Balamotis, M.A., Stevens, J.L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Berk, A.J. (2005). Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol. Cell* *17*, 683–694.
- Wang, M.D., Schnitzer, M.J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S.M. (1998). Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* *282*, 902–907.
- Wang, W., Zhou, H., Lin, H., Roy, S., Shaler, T.A., Hill, L.R., Norton, S., Kumar, P., Anderle, M., and Becker, C.H. (2003). Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Anal. Chem.* *75*, 4818–4826.
- Wang, X., Wang, J., Ding, Z., Ji, J., Sun, Q., and Cai, G. (2013). Structural flexibility and functional interaction of Mediator Cdk8 module. *Protein Cell* *4*, 911–920.
- Warner, J.R. (1989). Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* *53*, 256–271.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 437–440.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., and Williams, K.L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* *13*, 19–50.

- Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Young, R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* **84**, 235–244.
- Wind, M., and Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **22**, 327–336.
- Wolfgang Paul (1990). Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles (Nobel Lecture). *Angew. Chem.* **29**, 739–748.
- Wykoff, D.D., and O’Shea, E.K. (2005). Identification of sumoylated proteins by systematic immunoprecipitation of the budding yeast proteome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **4**, 73–83.
- Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P.A., and Fenselau, C. (2001). Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal. Chem.* **73**, 2836–2842.
- Yarmush, M.L., and Jayaraman, A. (2002). Advances in proteomic technologies. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 349–373.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* **408**, 225–229.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M.C. (1998). Rapamycin induces the G₀ program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4463–4470.
- Zhang, F., Sumibcay, L., Hinnebusch, A.G., and Swanson, M.J. (2004). A triad of subunits from the Gal11/tail domain of Srb mediator is an in vivo target of transcriptional activator Gcn4p. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6871–6886.
- Zhu, X., and Gustafsson, C.M. (2009). Distinct differences in chromatin structure at subtelomeric X and Y’ elements in budding yeast. *PLoS One* **4**, e6363.
- Zhu, X., Wirén, 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.
- Zhu, X., Zhang, Y., Bjornsdottir, G., Liu, Z., Quan, A., Costanzo, M., Dávila López, M., Westholm, J.O., Ronne, H., Boone, C., et al. (2011a). Histone modifications influence mediator interactions with chromatin. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8342–8354.
- Zhu, X., Liu, B., Carlsten, J.O.P., Beve, J., Nyström, T., Myers, L.C., and Gustafsson, C.M. (2011b). Mediator influences telomeric silencing and cellular life span. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2413–2421.
- Zybailov, B., Mosley, A.L., Sardi, M.E., Coleman, M.K., Florens, L., and Washburn, M.P. (2006). Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* **5**, 2339–2347.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich in der Zeit der Promotion unterstützt haben. Zu allererst bei Prof. Andreas Schlosser für dieses interessante Projekt, bei dem er mir immer mit geduldigem Rat zur Seite stand und für das Vertrauen. Die überaus angenehme, produktive und respektvolle Arbeitsatmosphäre in der AG Schlosser wurde außerdem durch die tatkräftige Unterstützung von Stephanie Lahmert und Dr. Jens Vanselow geschaffen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Danke Jens, für die vielen Datenprozessierungen und geduldigen Erklärungen über Boxplots-ich werde sie wohl nicht mehr vergessen. Vielen lieben Dank auch an Dr. Antje Schäfer und Christopher Stapf für deren Einweisungen in die Geheimnisse der Hefebiologie. Lieben Dank an Christiane, Beate, Christian und Conny, die immer die Ordnung in das persönliche Laborchaos brachten. Danke Markus Huppertz für die konspirativen Raucherpausen und Abhi und Larissa Höll für die tollen Ergebnisse. Es hat viel Spaß gemacht, mal selber Studenten durchs Labor zu scheuchen. Und natürlich ein herzliches Dankeschön an meine Leidensgenossen Rasha, Matthias und Mirco- ich hoffe ich bekomme bald wieder so nette Arbeitskollegen.

Zu guter Letzt aber mit höchster Priorität möchte ich mich bei meinem Mann, meinen Kindern und meine gesamte Familie für die viele Unterstützung und den überaus schönen Ausgleich zum Labor und eure unendlich Geduld bedanken.

Affidavit

Name, Vorname: Uthe, Henriette
Straße: Zweinaundorfer Straße 60
PLZ und Ort: 04318 Leipzig
Tel.: 0176/63350668
8 E-Mail: henriette.uthe@gmail.com

I hereby confirm that my thesis entitled “**Analyse des Interaktoms des Mediatorkomplexes in Sacchomyces Cerevisiae mittels Massenspektrometrie**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation **Analyse des Interaktoms des Mediatorkomplexes in Sacchomyces Cerevisiae mittels Massenspektrometrie** eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf - Curriculum vitae

Persönliche Daten

9

Geburtsdatum	03.06.1986
Familienstand	Verheiratet (geb. Kutscha)
Kinder	2 (6 Jahre, 9 Jahre)

Bildungsweg

07/2017-11/2017	Life Science Manager ATV, Leipzig Weiterbildung im Bereich Projektmanagement, Qualitätsmanagement, Betriebswirtschaft, Marketing
10/2012-03/2017	Doktorandin <i>Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg</i> AG Schlosser (Massenspektrometrie und Proteomics) Mitglied der Graduate School of Life Science (GSLS) Dissertationsthema: „Analyse des Interaktoms des Mediator Komplexes und dessen Modifikationen mittels Massenspektrometrie“
10/2007-06/2012	Diplom Biochemie/Molekularbiologie <i>Friedrich-Schiller-Universität, Jena</i> AG Görlach (NMR-Spektroskopie) Diplomarbeit: „Domänenspezifische Isotopenmarkierung von Aprataxin durch Intein-vermittelte Proteinligation“
09/1997-05/2005	Abitur <i>Geschwister-Scholl-Gymnasium, Sondershausen</i> Note: 1,7

Berufliche Erfahrungen

09/2013-03/2017	Wissenschaftliche Mitarbeiterin <u>AG Schlosser Massenspektrometrie und Proteomics) Würzburg</u>
03/2009-08/2012	Wissenschaftliche Hilfskraft <u>Max-Planck Institut für chemische Ökologie, Molekulare Ökologie Jena</u> Praktikum
02/2010-04/2010	<u>Cardiff School of Bioscience (Wales/Großbritannien)</u>
07/2008-08/2008	<u>Molekulare Gynäkologie, Universitätsklinikum Jena</u>

Publikationen

- 02/2017 Uthe, H., Vanselow, J.T., and Schlosser, A. (2017). Proteomic Analysis of the Mediator Complex Interactome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 7, 43584

Kompetenzen

Sprachkompetenzen	Englisch:	Verhandlungssicher
	Dänisch:	Konservationssicher
	Französisch:	Grundkenntnisse

Weiterbildungen / Trainings

- 11/2016 – 03/2017 Englischkurs (C1-C2)
- 2015-2016 Mentoring-Programm: Mentoring Life Science (Graduate School of Life Science)
Mentor: Dr. Thomas Schäfer (BKA Wiesbaden)
Themenschwerpunkte: Netzwerke pflegen und aufbauen, Konflikt Management, Persönlichkeitsentwicklung
- 03/2016 Stimmtraining (3 Tage)
- 11/2013 Statistische Datenanalyse mit R (5 Tage)
- 11/2012 Interkulturelle Kommunikation (2 Tage)

Weitere berufliche Erfahrungen

- 11/2014- heute **Ehrenamtlicher Mitarbeiter**
Aubiko e.V., Hamburg (Deutschland)
Verantwortungsbereich: Gastfamilienbetreuung Ostdeutschland
- 07/2005-09/2005 **Hotel Assistent/ Touristenführer**
Hotel Kulusuk (Arctic Wonderlands), Kulusuk (Grönland)

Referenzen und Kontakte

- Prof. Dr. Andreas Schlosser andreas.schlosser@virchow.uni-wuerzburg.de
+49 931 31-86888
- Prof. Dr. Christian Wegener christian.wegener@uni-wuerzburg.de
+49 931 31-85380
- Dr. Jens T. Vanselow jens.vanselow@virchow.uni-wuerzburg.de
+49 931 31-89193